

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Estudo da Influência de Nanopartículas de Ouro na Atividade de
Lipase de *Pseudomonas fluorescens* Imobilizada em
Nanopartículas Superparamagnéticas”**

Eduardo Arizono dos Reis*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA, área de
concentração: QUÍMICA
INORGÂNICA

Orientador(a): Profa. Dra. Caterina G. C. M. Netto
Coorientador(a): Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes

*** bolsista CAPES**

São Carlos - SP
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

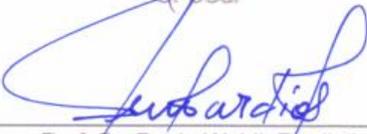
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Eduardo Arizono dos Reis, realizada em 19/02/2020:



Profa. Dra. Catenna Gruenwaldt Cunha Marques Netto
UFSCar



Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli
UFSCar



Prof. Dr. Leandro Helgueira de Andrade
USP

Em memória do Prof. Dr. Fernando Júnior Quites e meus avós maternos, Mario e Mituko Arizono, que foram peças importantes na minha história para almejar a pós-graduação.

“Experiment,
 Make it your motto day and night
Experiment
 And it will lead you to the light
The apple on the top of the tree
Is never too high to achieve
[...]
Be curious,
 Though interfering friends may frown,
Get furious,
 At each attempt to hold you down
If this advice you'll only employ
The future can offer you infinite joy
 And merriment
Experiment
 And you'll see”

Cole Porter

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado oportunidades de superar as dificuldades impostas pela vida.

A minha orientadora, Profa. Dra. Caterina G. C. M. Netto pela orientação, apoio e por me proporcionar a chance da elaboração deste trabalho. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fernando Cruz de Moraes, pelo auxílio e estrutura disponibilizada.

Aos companheiros e amigos do grupo de pesquisa, Caio, Letícia Klein, Millena e Katiana. A todos dos laboratórios de pesquisa Lerci e Labbes que me receberam de braços abertos e ajudaram direta ou indiretamente no trabalho desenvolvido, especialmente a Analu, Letícia Pires, Tamires, Jocely, Gabriel, André e Thiago.

Ao meu amor e companheira de batalha, Anelisse Brunca da Silva, que me ajudou e apoiou no decorrer do mestrado e sempre que possível na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Vinício José Pereira e Lúcia Arizono que tem sido minha maior fonte de inspiração. Agradeço imprescindivelmente as minhas tias maternas, em especial a Márcia, Adélia e Sônia Arizono, que me apoiaram desde a graduação e demonstram seu orgulho a cada encontro.

Ao Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli docente do departamento de Engenharia Química da UFSCar, que possibilitou a realização deste trabalho, fornecendo a enzima estudada. Agradeço também ao Prof. Dr. Edenir R. Pereira Filho, docente do departamento de Química, que auxiliou nos cálculos quimiométricos.

Ao departamento de química da UFSCar e ao corpo docente por, além de fornecer a oportunidade de fazer o mestrado, ser também fundamental na construção de todo o conhecimento obtido até hoje.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPQ, em especial a CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

A Profa. Dra. Michelle Fernanda Brugnera, do departamento de Química da UFMT, e sua família que auxiliou na chegada e adaptação em São Carlos.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

LISTA DE ABREVIATURAS

APTES – (3-Aminopropil)trimetilsilano

AuNP – Nanopartículas de ouro

AuNR – Nanobastões de ouro

Cit – Citrato de sódio

DRX – Difração de Raios-X

FAEE – Éster Etilico de Ácido Graxo (*Fatty Acid Ethyl Ester*)

FAME – Éster Metílico de Ácido Graxo (*Fatty Acid Methyl Ester*).

Fe₃O₄-Cit – Nanopartículas de Magnetita sintetizadas na presença do Estabilizante aniônico (citrato).

Fe₃O₄-ImC₁₀ – Nanopartículas de Magnetita sintetizadas na presença do Estabilizante catiônico alquilimidazólio

Fe₃O₄-SC₁₀ – Nanopartículas de Magnetita sintetizadas na presença do Estabilizante zwitteriônico alquilimidazólio

FTIR – Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier

FWHM – Larger à meia altura (*Full-Width at Half-Maximum*)

ImC₁₀ – Estabilizante catiônico alquilimidazólio

ImSC₁₀ – Estabilizante zwitteriônico alquilimidazólio

MEV-FEG – Microscópio eletrônico de varredura com fonte de emissão de campo

NPs – Nanopartículas

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RSM – Metodologia de Superfície de Resposta (*Response Surface Methodology*)

SPIONs– Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro
(*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*)

TEOS –Tetraetilortosilicato

UV-Vis – Ultravioleta-visível

XPS – Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. 1: Principais classes de enzimas no sistema EC. -----	3
TABELA 3.1: Especificações dos reagentes utilizados -----	26
TABELA 4. 1: Distância interplanar, parâmetro de célula e volume da célula unitária calculados para o material sintetizado e valores repostados na literatura para a magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). -----	47
TABELA 4. 2: Tamanho de partícula para as diferentes nanopartículas sintetizadas, posição de pico de maior intensidade correspondente e largura à meia altura (FWHM) do plano (311) conforme encontrado na análise de DRX. -----	52
TABELA 4. 3: Análise elementar para as diferentes nanopartículas funcionalizadas com APTES. -----	63
TABELA 4. 4: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para verificar a influência de 5 variáveis da imobilização enzimática (v1 a v5) na conversão do óleo de soja a biodiesel. -----	68
TABELA 4. 5: Valores de conversão do óleo de soja a biodiesel para as diferentes nanopartículas obtidos no planejamento fatorial fracionário. -----	69
TABELA 4. 6: Valores otimizados das variáveis que não apresentaram efeito significativo para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$. Em parênteses está indicado se o valor da variável corresponde ao limite inferior (–) ou superior (+). -----	74
TABELA 4. 7: Constante de desativação térmica para a enzima livre e imobilizada a 45 °C em diferentes intervalos de tempo. -----	82
TABELA 4. 8: Atividade residual da enzima lipase imobilizada nas diferentes estratégias de incorporação de 10 μL da solução de AuNR. A atividade residual foi calculada em relação a atividade da enzima imobilizada quando não há nanopartículas de ouro no bioconjugado. -----	100

TABELA B. 1: Distância interplanar, parâmetro de célula e volume da célula unitária calculados para as nanopartículas sintetizadas na presença dos estabilizantes. ----- 127

TABELA B. 2: Erro experimental, erro de um efeito e a variância calculados nos valores de conversão do ponto central para cada nanopartícula. ----- 127

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. 1: Representação esquemática da tríade catalítica de lipases (a) e o mecanismo de ação de lipases na hidrólise de ésteres (b). Fonte: Adaptado de Cen et al. (2019) ²⁵ . -----	5
FIGURA 1. 2: Mecanismo de ativação interfacial de lipases. Fonte: Adaptado de Palomo et al. (2005) ³⁰ . -----	6
FIGURA 1. 3: Métodos de imobilização enzimática. Fonte: Adaptado de Vaghari et al. (2016) ⁴⁶ . -----	8
FIGURA 1. 4: Principais características dos materiais de suporte utilizados para imobilização enzimática. Fonte: Adaptado de Zdarta et al. (2018) ⁶¹ .-----	13
FIGURA 1. 5: Célula unitária da magnetita (a) e da maghemita (b). As esferas vermelhas são os átomos de oxigênio, o poliedro verde mostra o ferro nos sítios octaédricos e o roxo mostra o ferro coordenado tetraedricamente. Fonte: Autoria própria. -----	16
FIGURA 1. 6: Ilustração esquemática da relação tamanho-coercividade de pequenas partículas magnéticas. Fonte: Adaptado de Akbarzadeh et al. (2014) ¹⁰³ e Leslie-Pelecky, & Rieke (1996) ⁹⁷ .-----	17
FIGURA 1. 7: Ciclo de histerese (magnetização vs campo magnético aplicado) característicos de nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnéticas. Para comparação, também são mostrados comportamentos paramagnéticos e diamagnéticos. Fonte: Adaptado de Arruebo et al. (2007) ¹⁰⁵ e Chee et al (2018) ⁹⁵ . -----	18
FIGURA 1. 8: Ilustração esquemática mostrando os vários métodos de síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. Fonte: Sodipo et al. (2016) ¹¹⁰ .-----	19
FIGURA 1. 9: Taça de Lycurgus em luz refletida (a) e transmitida (b). Fonte: FREESTONE et al. (2007) ¹¹⁸ . -----	21
FIGURA 1. 10: Vitral da Sainte-Chapelle em Paris (a) e um exemplo de porcelana Famille-Rose: o vaso Mille Fleurs (b). Fonte: SCHAMING et al. (2015) ¹¹⁶ . --	21

FIGURA 1. 11: Representação da ressonância plasmônicas de superfície para uma nanopartícula esférica. Fonte: OLSON et al. (2015) ¹²¹ . -----	22
FIGURA 1. 12: Representação esquemática dos métodos básicos de preparação de nanopartículas metálicas. Fonte: ALEX et al. (2015) ¹²³ . -----	24
FIGURA 3. 1: Representação esquemática da ordem de realização dos experimentos. -----	30
FIGURA 3. 2: Estrutura dos estabilizantes inseridos na síntese solvotermal. --	32
FIGURA 4. 1: Ilustração esquemática do mecanismo de formação das partículas de Fe ₃ O ₄ . Fonte: Adaptado de Fan e colaboradores (2011) ¹⁵⁶ . -----	45
FIGURA 4. 2: Difratoogramas de raios X para as nanopartículas sintetizadas sem a presença de estabilizante. Os padrões de difração da magnetita (JCPDS nº 19-0629) e da maghemita (JCPDS nº 39-1346) são mostrados na região inferior do gráfico para comparação. -----	46
FIGURA 4. 3: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) para as nanopartículas sintetizadas sem a presença de estabilizantes. -----	49
FIGURA 4. 4: Difratoograma de raios X do Fe ₃ O ₄ obtido pelo método solvotermal na a presença de estabilizantes de diferentes estabilizantes. -----	50
FIGURA 4. 5: Ilustração esquemática das etapas de atuação dos estabilizantes na síntese solvotermal. Fonte: Adaptado de Fan et al. (2011) ¹⁵⁶ . -----	51
FIGURA 4. 6: Espectro de FTIR para as nanopartículas de Fe ₃ O ₄ sintetizadas sem a presença de estabilizantes e na presença de diferentes estabilizantes. -----	53
FIGURA 4. 7: Espectros de FTIR para as diferentes nanopartículas de Fe ₃ O ₄ recobertas pelo método de Stöber na região de 4000 a 300 cm ⁻¹ e região de 500 a 300 cm ⁻¹ inserido nos gráficos. -----	56
FIGURA 4. 8: Espectros de FTIR para as diferentes nanopartículas de Fe ₃ O ₄ recobertas pelo método Bifase na região de 4000 a 300 cm ⁻¹ e região de 500 a 300 cm ⁻¹ inserido nos gráficos. -----	58

- FIGURA 4. 9: Densidade de grupos amino para as diferentes nanopartículas funcionalizadas (a) e representação esquemática da relação entre o tamanho das nanopartículas recobertas e a densidade de grupos amino superficiais (b).----- 60
- FIGURA 4. 10: Ilustração esquemática do efeito do estabilizante nas nanopartículas de magnetita: proposta da estabilização utilizando o citrato (a) e o estabilizante zwitteriônico (b).----- 62
- FIGURA 4. 11: Reações de obtenção de esteres alquílicos de ácido graxo que podem ser catalisadas por enzimas lipase: Transesterificação (a) e Hidroesterificação (b). ----- 64
- FIGURA 4. 12: Efeito do teor de água na conversão do óleo de soja a FAME catalisada pela enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens*.----- 66
- FIGURA 4. 13: Espectro de RMN de ^1H para a mistura reacional em CDCl_3 com aquisição de pontos de 16 K após 24 horas de catalise pela enzima lipase imobilizada. Em destaque estão os duplos dupletos referentes ao triacilglicerídeo (TAG), o singlete referente aos hidrogênios metílicos do FAME (M), os picos correspondentes aos produtos da hidrólise, 1,2-diglicerídeo (1,2-DG) e o 2-monoglicerídeo (2-MG).----- 67
- FIGURA 4. 14: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato como estabilizante ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$). A linha azul vertical mostra a posição do zero no eixo x e as duas linhas verticais vermelhas indicam o intervalo de confiança. ----- 71
- FIGURA 4. 15: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante catiônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$).----- 72
- FIGURA 4. 16: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante zwitteriônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}$).----- 72

- FIGURA 4. 17: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas funcionalizadas com dimetilglioxima. ----- 73
- FIGURA 4. 18: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas funcionalizadas com HPO_3 . ----- 74
- FIGURA 4. 19: Otimização do pH de imobilização frente a hidroesterificação do óleo de soja a FAME. ----- 76
- FIGURA 4. 20: Ilustração esquemática do cross-linking com glutaraldeído de proteínas adsorvidas iônica em suportes catiônicos aminados. Fonte: Adaptado de Betancor et al. (2006)¹⁸⁵.----- 77
- FIGURA 4. 21: Atividade enzimática da enzima lipase imobilizada nos suportes magnéticos expressos em U g^{-1} e a atividade residual relativa em função da enzima livre. ----- 79
- FIGURA 4. 22: Atividade relativa do sobrenadante de imobilização e do sobrenadante após a lavagem com tampão 0,5 M em função da solução inicial de enzima usado na imobilização. ----- 80
- FIGURA 4. 23: Efeito do tempo de incubação a 45°C na atividade da enzima lipase livre e imobilizada nos suportes magnéticos ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$) durante diferentes tempos de incubação em pH 8,0. ----- 81
- FIGURA 4. 24: Imagens de microscopia de transmissão do suporte magnético de Fe_3O_4 recoberto com sílica (SiO_2) ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$) em diferentes ampliações. ----- 83
- FIGURA 4. 25: Imagens de microscopia de transmissão do suporte magnético de Fe_3O_4 sintetizado com estabilizante aniônico e recoberto com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$) em diferentes ampliações. ----- 84
- FIGURA 4. 26: Imagens de microscopia de transmissão do suporte magnético de Fe_3O_4 sintetizado na presença do estabilizante catiônico e recoberto com SiO_2 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) em diferentes ampliações. ----- 84
- FIGURA 4. 27: Avaliação do efeito da quantidade de substrato frente a conversão do óleo de soja a biodiesel pela reação de hidroesterificação: quantidade de óleo

avaliado na faixa de 150-500 μ L utilizando metanol e etanol como acil receptor na proporção 1:4. -----	86
FIGURA 4. 28: Conversões do óleo de soja a FAME em diferentes temperaturas (37, 47 e 57 °C) para as enzimas imobilizadas no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ (b) e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ (a).-----	88
FIGURA 4. 29: Espectros de FTIR da enzima livre e do suporte ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) com a enzima lipase imobilizada, após passar por diferentes tempos de hidrólise. -----	92
FIGURA 4. 30: Espectro de absorção UV-vis da liberação da enzima do suporte em diferentes tempos de hidrólise. -----	93
FIGURA 4. 31: Atividade enzimática por grama de suporte frente a hidrólise do óleo de oliva após ciclos consecutivos de remoção e imobilização para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$.-----	94
FIGURA 4. 32: Espectros de FTIR dos suportes ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$) após 3 ciclos de imobilização do biocatalisador.-----	95
FIGURA 4. 33: Espectro de UV-Vis da solução de nanopartículas esféricas de ouro estabilizadas por citrato. -----	96
FIGURA 4. 34: Estratégias estudadas de incorporação do ouro ao bioconjugado. -----	97
FIGURA 4. 35: Atividade hidrolítica relativa da enzima imobilizada com diferentes quantidades de ouro incorporado ao bioconjugado pela estratégia A. -----	98
FIGURA 4. 36: Espectro de UV-Vis da solução de nanobastões de ouro estabilizadas por CTAB. -----	99
FIGURA 4. 37: Atividade hidrolítica da enzima imobilizada com diferentes quantidades de ouro (AuNR) por grama de suporte. Os nanobastões de ouro foram incorporados ao bioconjugado pela estratégia D.-----	101
FIGURA 4. 38: Atividade hidrolítica da enzima imobilizada com diferentes quantidades de ouro (AuNR) por grama de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$. -----	102

- FIGURA A. 1: Espectro de RMN de ^1H do líquido iônico ImC_{10} em CDCl_3 com aquisição de pontos de 64 K. ----- 126
- FIGURA B. 1: Espectro de absorção UV-vis do 4-benzaldeído para concentrações na faixa de 1-100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (a) e Curva analítica para o 4-benzaldeído em $\lambda_{\text{max}}=282\text{ nm}$ (1-100 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (b). ----- 127
- FIGURA B. 2: Curva analítica para quantificação de ácido graxo $\lambda_{\text{max}}=715\text{ nm}$. Foi usado como padrão o ácido oleico nas concentrações de 0-50 $\mu\text{mol L}^{-1}$.-- 128
- FIGURA C. 1: Espectro de FTIR para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HPO}$ ----- 130
- FIGURA C. 2: Densidade de grupos amino para as nanopartículas funcionalizadas obtidas por colaboração ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HPO}$). ----- 130

RESUMO

ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE NANOPARTÍCULAS DE OURO NA ATIVIDADE DE LIPASE DE *Pseudomonas fluorescens* IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS. O crescente interesse na aplicação de biocatalisadores em diversos setores industriais fez com que a imobilização enzimática ganhasse destaque entre as possíveis estratégias de viabilizar a utilização destes catalisadores. Esta estratégia tem como principal vantagem a estabilização do biocatalisador frente a alterações de temperatura, pressão e pHs, entretanto, há desvantagens como a perda de atividade frente ao biocatalisador livre e o empiricismo da técnica. Para contornar estes problemas, diferentes suportes, protocolos de imobilização e sistemas biocatalíticos tem sido estudados. Um dos focos deste trabalho foi o de remover o empiricismo da técnica de imobilização utilizando planejamento fatorial. Para isto, escolheu-se as nanopartículas magnéticas como suporte devido à facilidade de separação do meio reacional com o uso de um campo magnético externo. Deste modo, para avaliar a influência da modificação superficial de partículas magnéticas no processo de imobilização enzimática, foram sintetizadas nanopartículas de magnetita pelo método solvotermal utilizando estabilizantes com diferentes cargas líquidas: catiônico, zwitteriônico e aniônico. Pelos resultados de DRX observa-se que os suportes magnéticos sintetizados na presença de surfactante aniônico apresentaram menor tamanho (≈ 10 nm), entretanto, as partículas sintetizadas na presença do surfactante catiônico apresentaram maiores densidades de grupos aminas do que as outras duas partículas. Escolheu-se a lipase de *Pseudomonas fluorescens* como enzima modelo para desenvolver o planejamento fatorial na otimização das variáveis no protocolo de imobilização. Otimizou-se os parâmetros concentração de lipase, massa de nanopartícula utilizada, concentração de agente reticulante (*cross-linker*), pH e tempo de imobilização. Observou-se que apenas o pH apresentou maior efeito na imobilização, em que quanto menor o pH maior era a eficiência de imobilização, atingindo-se um

máximo em pH 5, próximo ao ponto isoelétrico da enzima ($pI = 4,7$). Observou-se que quanto maior a eficiência de imobilização, maiores eram os valores de conversão do óleo de soja a ésteres de ácido graxo pela hidrólise seguido de esterificação. Dentre as nanopartículas otimizadas observou-se por TEM que no processo de recobrimento houve aglomeração das mesmas e consequente diminuição da área superficial, entretanto foi observado melhor conversão para a nanopartícula aglomerada que para as nanopartículas mais dispersas. Também foram testados a reutilização do suporte após a desnaturação das enzimas imobilizadas e observou-se que é possível a reutilização do suporte em até 3 ciclos consecutivos de imobilização mantendo-se a atividade da enzima. Quando estudado a influência das nanopartículas de ouro (AuNPs), observou-se que a ordem de adição das partículas de ouro sobre as enzimas interfere no resultado, em que a adição das AuNPs após a imobilização da lipase nas nanopartículas magnéticas acarretava em uma piora da resposta catalítica. Por outro lado, ao adicionar as AuNPs à lipase antes da imobilização acarretou em uma melhora de até 50% na atividade hidrolítica da enzima imobilizada na presença de luz quando comparada com a atividade da enzima imobilizada sem a presença de AuNR. Quando comparado com a atividade da enzima imobilizada na ausência de luz obteve-se uma melhora na atividade de cerca e 4 vezes na atividade da enzima após a incidência de luz no sistema.

ABSTRACT

STUDY OF THE INFLUENCE OF GOLD NANOPARTICLES IN THE ACTIVITY OF IMMOBILIZED LIPASE FROM *Pseudomonas fluorescens* IN SUPERPARAMAGNETIC NANOPARTICLES. The growing interest in the application of biocatalysts in several industrial sectors made the enzymatic immobilization stand out among the possible strategies to enable the use of these catalysts. This strategy has the main advantage of stabilizing the biocatalyst even in changes in temperature, pressure and pH, however, there are disadvantages such as the loss of activity in relation to the free biocatalyst and the empiricism of the technique. To overcome these problems, different supports, immobilization protocols and biocatalytic systems have been studied. One of the focuses of this work was to remove the empiricism of the immobilization technique using factorial planning. For this, magnetic nanoparticles were chosen as a support due to the ease of separation from the reaction medium with the use of an external magnetic field. Thus, to evaluate the influence of the surface modification of magnetic particles in the enzymatic immobilization process, magnetite nanoparticles were synthesized by the solvothermal method using stabilizers with different liquid charges: cationic, zwitterionic and anionic. From the XRD results, it is observed that the magnetic supports synthesized in the presence of anionic surfactant were smaller (≈ 10 nm), however, the particles synthesized in the presence of the cationic surfactant showed higher densities of amine groups than the other two particles. *Pseudomonas fluorescens* lipase was chosen as a model enzyme to develop factor planning in the optimization of variables in the immobilization protocol. The optimized parameters were lipase concentration, nanoparticle mass, cross-linker concentration, pH and immobilization time. It was observed that only pH had the greatest effect on immobilization, in which the lower the pH the greater the efficiency of immobilization, reaching a maximum at pH 5, close to the isoelectric point of the enzyme ($pI = 4.7$). It was observed that the greater the immobilization efficiency, the higher the conversion values of

soybean oil into fatty acid esters by hydrolysis followed by esterification. Among the optimized nanoparticles, it was observed by TEM that in the coating process there was an agglomeration of the same and a consequent decrease in the surface area, however, a better conversion was observed for the agglomerated nanoparticle than for the more dispersed nanoparticles. The reuse of the support after the denaturation of the immobilized enzymes was also tested and it was observed that it is possible to reuse the support in up to 3 consecutive immobilization cycles while maintaining the enzyme activity. When studying the influence of gold nanoparticles (AuNPs), it was observed that the order of addition of the gold particles on the enzymes interferes in the result, in which the addition of AuNPs after the immobilization of lipase in the magnetic nanoparticles caused a worsening of catalytic response. On the other hand, adding AuNPs to lipase before immobilization resulted in an improvement of up to 50% in the hydrolytic activity of the enzyme immobilized in the presence of light when compared to the activity of enzyme without AuNP. When compared to the activity of the immobilized enzyme in the absence of light, there was an improvement in the activity of about 4 times in the activity of the enzyme after the incidence of light in the system.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enzimas	2
<i>1.1.1. Enzimas Lipase</i>	4
1.2. Imobilização Enzimática	6
<i>1.2.1. Planejamento Fatorial Aplicado a Imobilização Enzimática</i>	10
1.3. Materiais para Suporte	12
<i>1.3.1. Nanopartículas Magnéticas</i>	14
<i>1.3.1.1. Nanopartículas Superparamagnéticas</i>	16
1.4. Nanopartículas plasmônicas	20
2. OBJETIVOS	25
3. PARTE EXPERIMENTAL	26
3.1. Reagentes e soluções	26
3.2. Instrumentação	28
3.3. Metodologia	29
<i>3.3.1. Síntese do Estabilizante Catiônico</i>	30
<i>3.3.2. Síntese das Nanopartículas Magnéticas</i>	31
<i>3.3.2.1. Síntese solvotermal sem estabilizante</i>	31
<i>3.3.2.2. Síntese solvotermal com estabilizantes</i>	31
<i>3.3.3. Recobrimento das Nanopartículas de Fe₃O₄</i>	32
<i>3.3.3.1. Método Stöber</i>	33
<i>3.3.3.2. Método Bifase</i>	33
<i>3.3.4. Funcionalização das Nanopartículas de Fe₃O₄@SiO₂</i>	33
<i>3.3.5. Densidade de Grupos Amina</i>	34

3.3.7. Imobilização Enzimática	35
3.3.7.1. Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-2}	36
3.3.7.2. Otimização do pH de Imobilização	37
3.3.7.3. Estudo de Atividade e Estabilidade da Enzima Imobilizada	37
3.3.8. Otimização das Condições Catalíticas	39
3.3.9. Reuso do suporte	39
3.3.10. Síntese das nanopartículas de ouro	40
3.3.10.1. Síntese das Nanopartículas Esféricas de Ouro (AuNP)	40
3.3.10.2. Síntese dos Nanobastões de Ouro (AuNR)	41
3.3.11. Estratégias de Incorporação das Nanopartículas de Ouro	41
3.3.11.1. Estratégia A	42
3.3.11.2. Estratégia B	42
3.3.11.3. Estratégia C	43
3.3.11.4. Estratégia D	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1.1. Síntese e Caracterização das Nanopartículas Magnéticas	44
4.1.2. Recobrimento das Nanopartículas	54
4.1.3. Funcionalização das Nanopartículas	59
4.1.4. Estudo da Reação de Obtenção de Esteres Metílico de Ácido Graxo	
63	
4.1.5. Imobilização enzimática	68
4.1.6. Otimização do pH de Imobilização	75
4.1.7. Estudo de Atividade Hidrolítica e Estabilidade da Enzima	
Imobilizada	77

<i>4.1.8. Caracterização Morfológica por TEM das Nanopartículas Otimizadas</i>	82
<i>4.1.9. Otimização dos Substratos</i>	85
<i>4.1.10. Avaliação da Temperatura de Catálise</i>	87
<i>4.1.11. Reuso do Suporte</i>	91
<i>4.1.12. Estudo do Efeito Plasmônico na Enzima Lipase de Pseudomonas fluorescens</i>	95
5. CONCLUSÕES	104
6. REFERÊNCIAS	106
Apêndice A	125
Apêndice B	127
Apêndice C	130

1. INTRODUÇÃO

Desde de os primórdios, as enzimas desempenharam um papel fundamental no desenvolvimento humano¹. No início, a aplicação das mesmas estava associada com o uso inconsciente de microrganismos na produção de alimentos¹⁻³. O primeiro indício de utilização de enzimas para o processamento de alimento remota a 7000 AC, na China, para produção de bebida alcoólica¹. Nos últimos anos, as enzimas ganharam reconhecimento global por seus usos difundidos em vários setores das indústrias, por exemplo, alimentos, agricultura, produtos químicos, medicamentos e energia^{3,4}.

A utilização das enzimas tem melhorado o processamento químico industrial em diversos aspectos⁵, principalmente no âmbito ambiental, em que esses biocatalisadores tornam os processos mais brandos, sustentáveis, ambientalmente amigáveis e apresentam elevada conversão⁶. Quando comparado aos catalisadores baseados em metais, que dependem do uso intensivo de energia para seu processamento, os biocatalisadores enzimáticos são biodegradáveis, podem ser facilmente restituídos⁵ e possuem elevada seletividade, ademais as enzimas podem ser imobilizadas e reutilizadas^{4,5}. Além da vantagem ambiental, a aplicação destes biocatalisadores no setor industrial está relacionado com a redução da demanda de energia e de matéria-prima, emissões de poluentes e resíduos, ocasionando em uma diminuição dos custos do processo⁷.

As classes de enzimas que atualmente lideram o mercado global de enzimas industriais são as carboidrases, proteases e lipases, que correspondem a 50%, 25% e 10%, respectivamente⁸. Este mercado foi estimado em 2016 um valor compreendido entre US \$ 5,0 a US \$ 5,5 bilhões^{4,8} prevendo um aumento 26% em 2021 com tendências de crescimento na utilização de enzimas em indústrias que possuem maior geração de resíduos, como as indústrias têxteis, de papel, couro e biodiesel⁴. Tais projeções de mercado abrem um viés de desenvolvimento e aplicação de biocatalisadores imobilizados^{4,9}. Nestes, é imprescindível otimizar as relações estrutura-função dos conjugados enzimáticos, minimizando os custos

de produção dos componentes individuais (suporte e biocatalizador), bem como os custos de implementação do processo biocatalítico⁹.

Mesmo já sendo uma realidade a aplicação de enzimas como biocatalisadores em processos industriais, muitas vezes o objetivo de aplicação das mesmas não é alcançado, como manter elevados rendimentos associados com maior sustentabilidade do processo. Deste modo, empregando os conhecimentos científicos, além de evitar esse tipo de falhas e tornar o processo mais robusto¹, é possível também fazer descobertas e desenvolver biocatalisadores com as propriedades desejadas, ampliando ainda mais o campo de aplicação desses catalisadores.

1.1. Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos, também conhecidos como biocatalisadores, que atuam aumentando a velocidade de reações em organismos vivos¹⁰. A eficiência biocatalítica das enzimas são conhecidas desde o início do século XIX com a descoberta da capacidade da enzima diástase de converter amido em açúcar¹¹. Até então, apenas as desvantagens da utilização dos biocatalisadores permeavam o meio científico¹², dentre estas desvantagens estavam a especificidade restrita de substrato e a baixa estabilidade do catalisador enzimático. Apenas no século XX, com a descoberta de novas enzimas e o advento do DNA recombinante, que o grande potencial desses biocatalisadores atraíram a atenção dos pesquisadores^{11,12}.

Assim como os demais catalisadores, as enzimas atuam aumentando a taxa de reações químicas sem serem consumidas e sem alterar o equilíbrio químico entre reagentes e produtos¹³, portanto, em princípio, podem acelerar a reação direta e inversa igualmente^{13,14}. A atividade catalítica das enzimas (E) implica na ligação do substrato (S) ao sítio catalítico do biocatalisador para formar um complexo enzima-substrato (ES)^{12,13}. O substrato ligado ao sítio

catalítico é, em seguida, convertido no produto da reação (P) e liberado da enzima. A catálise enzimática segue o modelo cinético descrito por Michaelis e Menten¹⁵, em 1913, que apresenta uma cinética de saturação em relação ao substrato (ordem zero em alta concentração e primeira ordem em baixa concentração) e é de primeira ordem em relação à enzima¹². A catálise enzimática pode ser representada da seguinte forma¹³:



As enzimas são classificadas de acordo com a reação que elas catalisam^{11,16} e cada enzima tem seu nome sistemático, um nome recomendado e um identificador único do tipo EC 1.2.3.4^{11,16,17}. No código identificador, EC é referente a Comissão de Enzimas (do inglês *Enzyme Commission*) do Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB)¹⁶, o primeiro número corresponde a 6 classes diferentes e descreve o tipo de reação química catalisada^{11,17} (ex. oxidase catalisa reação de oxirredução – EC 1), o segundo e o terceiro número identifica o substrato envolvido e o quarto é um número de catálogo¹⁶. Na tabela abaixo estão listadas as principais classes de enzimas de acordo com a Comissão de Enzimas (EC).

TABELA 1. 1: Principais classes de enzimas no sistema EC.

<i>Primeiro digito EC</i>	<i>Classe de enzimas</i>	<i>Tipo de Reação</i>
<i>i.</i>	Oxirredutases	Oxidação/redução
<i>ii.</i>	Transferases	Transferência de átomo/grupo funcional
<i>iii.</i>	Hidrolases	Hidrólise
<i>iv.</i>	Liasas	Remoção de grupo funcional
<i>v.</i>	Isomerases	Isomerização
<i>vi.</i>	Ligases	União de duas moléculas

Fonte: Robinson, P. K (2015)¹⁰.

1.1.1. Enzimas Lipase

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são enzimas que pertencem à classe das enzimas hidrolíticas e catalisam a hidrólise de óleos (triacilgliceróis) a álcoois e ácidos graxos^{18,19}. Estas enzimas catalisam preferencialmente a hidrólise de ésteres de ácido graxo de cadeia longa, apesar de também atuarem, em menor velocidade, na hidrólise de substratos solúveis¹⁹. Devido a sua versatilidade, as lipases podem ser usadas para catalisar a reação inversa como esterificação²⁰⁻²², transesterificação^{20,21,23} e interesterificação^{21,24}. Por consequência da sua natureza reversível, a concentração de água é um fator crucial para o controle do equilíbrio entre a reação direta e inversa¹⁹.

As lipases possuem o sítio ativo constituído de três resíduos de aminoácidos: serina, histidina e aspartato (FIGURA 1.1-a), e sua ação ocorre de acordo com o mecanismo clássico da tríade catalítica Ser-His-Asp²⁵(FIGURA 1.1-b). Neste mecanismo, inicialmente o resíduo de aspartato forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo de histidina, permitindo que o nitrogênio do anel imidazólico atue como uma base (devido ao aumento no pKa) e desprotona o resíduo de serina²⁶. A serina desprotonada atua, então, como um nucleófilo e ataca a carbonila do grupo éster do substrato formando um intermediário tetraédrico que faz ligações de hidrogênio com átomos próximos, formando um oxianion que estabiliza o estado de transição²². Por fim o álcool é liberado deixando um complexo acil-lipase, que é hidrolisado, liberando ácido graxo e regenerando o sítio catalítico da enzima. Recentemente, enzimas lipases artificiais com modificação na tríade catalítica tem sido desenvolvidas e apresentam atividade e mecanismo diferentes das hidrolases naturais²⁵.

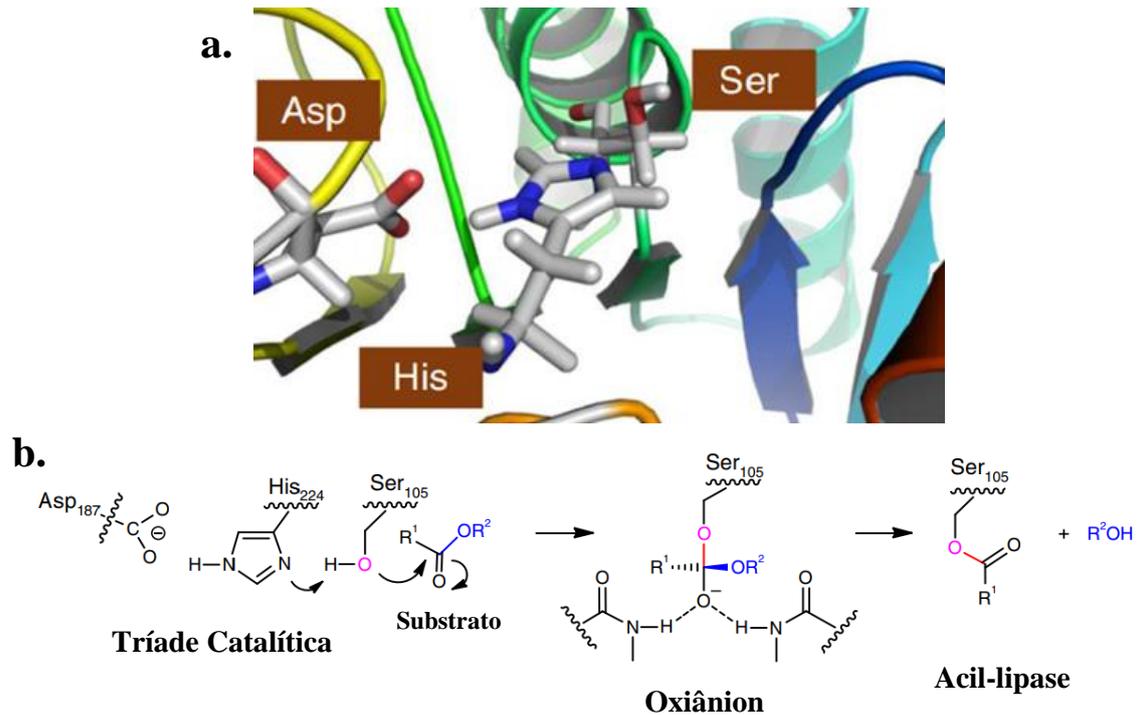


FIGURA 1. 1: Representação esquemática da tríade catalítica de lipases (a) e o mecanismo de ação de lipases na hidrólise de ésteres (b). Fonte: Adaptado de Cem et al. (2019)²⁵.

As lipases podem se apresentar, basicamente, em duas conformações: em sua forma aberta e/ou em sua forma fechada²⁷. Em sua forma fechada uma α -hélice cobre o sítio ativo e impede o acesso do substrato. Essa α -hélice, conhecido também como tampa ou *lid*, é anfifílico^{28,29}, com a parte interna hidrofóbica e a parte externa hidrofílica, e quando em contato com a interface óleo-água a tampa se desloca expondo o sítio ativo²⁹, na região hidrofóbica da enzima, permitindo o acesso do substrato, como mostrado na FIGURA1.2. Neste caso a enzima se encontra em sua forma aberta, esse fenômeno também é conhecido como ativação interfacial³⁰.

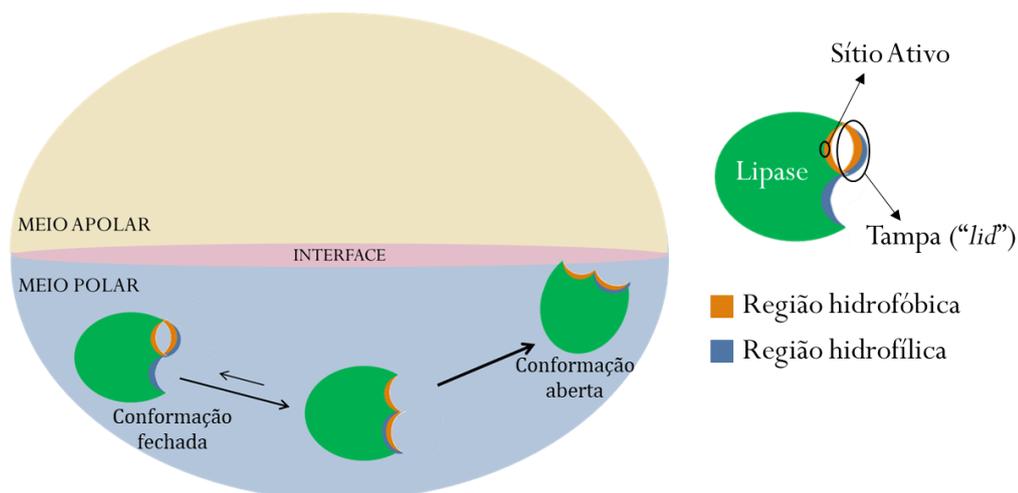


FIGURA 1. 2: Mecanismo de ativação interfacial de lipases. Fonte: Adaptado de Palomo et al. (2005)³⁰.

Dentre a grande variedade de fontes naturais de enzimas lipases (plantas, animais, bactérias e fungos)³¹, as fontes microbianas se destacam pela versatilidade e facilidade de produção em larga escala³². As lipases bacterianas, em especial, as de origem de bactérias do gênero *Pseudomonas* tem atraído atenção para aplicações biotecnológicas^{33,34}, devido ao baixo custo e a grande disponibilidade comercial associado as mesmas³⁴. Entre suas aplicações biotecnológicas, as lipases podem ser aplicadas em diferentes setores industriais³², como nas indústrias de alimentos^{3,21}, formulação de detergentes^{21,35}, cosmética²¹, farmacêutica³⁶, couro^{8,21}, têxtil e papel³⁷, produção de biodiesel²⁰ e biopolímero³⁸ ou pré-tratamento de água residuais com elevado teor de lipídios³⁹.

1.2. Imobilização Enzimática

Apesar das enzimas apresentarem propriedades interessantes, como elevada atividade catalítica e seletividade⁴⁰, sua aplicação em reatores industriais ainda é um desafio, uma vez que algumas de suas características não são compatíveis com condições industriais¹⁴, tais como: solubilidade em água, fácil desnaturação em condições diferentes das fisiológicas e possível inibição por substratos e produtos da reação. Uma alternativa para contornar essas desvantagens é a imobilização enzimática, em que o biocatalisador é transformado

do estado solúvel para um estado insolúvel, prendendo-o a um material insolúvel que atue como suporte ou encapsulando os catalisadores dentro de uma matriz polimérica de origem sintética ou natural^{41,42}.

A primeira enzima imobilizada foi descrita na literatura em 1940, em uma patente de Langlois e Dale, na qual relatava a imobilização da amilase para a produção de xarope de milho^{43,44}. Apenas anos depois, em 1978, que foi dada uma definição ao termo “imobilização enzimática” por Chibata⁴¹, segundo o autor imobilização enzimática são “enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região definida do espaço com retenção de suas atividades catalíticas que podem ser usadas repetidamente e continuamente” (tradução livre)⁴⁵. Desde então, a imobilização enzimática tem atraído a atenção da comunidade científica por possibilitar a utilização em sistemas industriais e a reutilização dos biocatalisadores⁴⁶, tornando o processo viável economicamente¹⁷.

Em geral, além da reusabilidade, enzimas imobilizadas possuem diversas vantagens frente a enzima livre^{17,41}, tais como: maior estabilidade térmica e química, não contaminação do produto pelo biocatalisador e facilidade de controle do processo biocatalítico. Além disso, as enzimas imobilizadas geralmente apresentam especificidade aprimorada, maior seletividade e maior tempo de armazenamento⁴⁷. Como apresentado na FIGURA 1.3, existem diversas estratégias para a imobilização enzimática que podem ser divididos basicamente em: (i) ligação ao suporte, (ii) aprisionamento e (iii) cross-linking (reticulação).

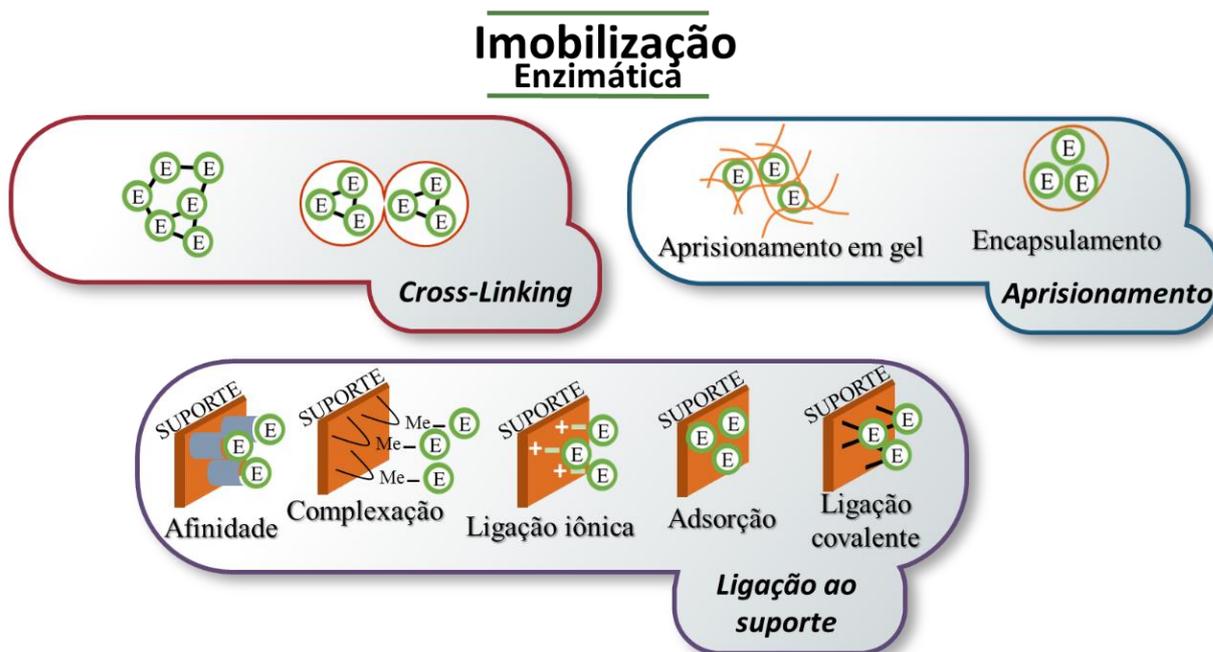


FIGURA 1. 3: Métodos de imobilização enzimática. Fonte: Adaptado de Vaghari et al. (2016)⁴⁸.

Nos métodos de imobilização de ligação ao suporte, as enzimas podem ser imobilizadas por meio de interações que variam de adsorção física reversível (como interações hidrofóbicas e van der Waals) a ligações covalentes estáveis⁴⁸⁻⁵⁰. A força da ligação geralmente está inversamente relacionada à facilidade com que pode ser revertida^{48,49}, neste caso, o conceito de reversibilidade está associado a possibilidade de retirar o biocatalisador do suporte sem que este perca suas propriedades catalíticas⁴⁹.

Apesar da reversibilidade e da simplicidade experimental, a adsorção física é geralmente fraca para manter a enzima imobilizada no suporte tornando desfavorável seu uso em condições industriais^{46,48,51}. Em contrapartida, a ligação iônica e a ligação covalente são ligações mais fortes e geralmente impedem a lixiviação da enzima do suporte^{46,48,52}. As ligações covalentes são geralmente formadas através de reações entre os grupos funcionais de cadeias laterais de enzimas não modificadas, como lisina, cisteína ou resíduos de ácido aspártico e glutâmico^{46,48} e com diferentes grupos funcionais reativos como imidazol, indolil, hidroxil fenólico, etc⁴⁶.

O aprisionamento de enzimas geralmente ocorre quando se utiliza suportes orgânicos⁵³, como polímeros, fibras e géis, e é feito pela combinação de ligações covalentes e não covalentes que impedem a lixiviação do biocatalisador^{46,48}. Este método permite que o substrato e os produtos passem através da membrana em que a enzima se encontra aprisionada para que ocorra a catálise⁵⁴. Deste modo, a principal limitação do método é a transferência de massa através das membranas ou géis⁴⁸. O aprisionamento geralmente requer a síntese da matriz polimérica na presença da enzima⁴⁸.

O processo de reticulação de enzimas envolve a ligação dos biocatalisadores entre si por reagentes ou ligantes bi ou multifuncionais⁵⁴. Dessa forma, são formados agregados tipicamente insolúveis de peso molecular muito alto^{48,54}, resultando em um biocatalisador essencialmente composto de enzimas 100% ativas⁴⁸. Entretanto, por não utilizar nenhum suporte como matriz, os agregados geralmente são gelatinosos, o que muitas vezes limita sua aplicação⁵⁴. Uma alternativa é o uso de uma matriz carreadora, porém, inevitavelmente leva à diluição da atividade enzimática, devido à introdução de um material não catalítico, que resulta em menores rendimentos e produtividades no espaço-tempo⁵⁰.

Apesar de suas vantagens, a imobilização de enzimas em um suporte pode induzir mudanças conformacionais na enzima devido as forças de interação entre a enzima e o suporte¹⁷, ocasionando em uma diminuição na atividade enzimática da enzima imobilizada. Cada método de imobilização apresenta vantagens e desvantagens⁴⁹ e a escolha do método mais adequado de imobilização, assim como o tipo de suporte, orgânico ou inorgânico, deve ser definido avaliando a atividade enzimática, a estabilidade e a durabilidade desejável após a imobilização⁴³..

Assim como qualquer processo físico ou químico, a eficiência da imobilização enzimática depende de uma gama de variáveis que dependem do tipo de suporte e método de imobilização, como a concentração, pH, temperatura

e tempo de reação¹⁷. Apesar do grande número de pesquisas nas últimas décadas acerca da imobilização enzimática, ainda prevalece o empiricismo sobre o processo de imobilização^{55,56}. Algumas estratégias podem ser utilizadas para minimizar esse empiricismo, como por exemplo, o uso de ferramentas quimiométricas⁵⁷⁻⁶⁰, tais como planejamento fatorial na otimização das variáveis no processo de imobilização enzimática. Isto faz com que se minimize o número de experimentos e permite estudar o efeito de interação de duas ou mais variáveis^{56,61}. Através de uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseado no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais⁵⁹ obtém-se uma superfície de resposta, a qual permite fazer previsões estatísticas para as melhores condições frente a diferentes respostas⁵⁶.

1.2.1. Planejamento Fatorial Aplicado a Imobilização Enzimática

Devido à relevância da imobilização na resposta enzimática⁶², a otimização dos parâmetros no processo de imobilização (por exemplo, tempo, temperatura, enzima e concentração de suporte, quantidade de agente reticulante) torna-se fundamental para alcançar o melhor desempenho do biocatalisador. O uso do método convencional de otimização, no qual as variáveis de um determinado sistema são otimizadas, avaliando a resposta independente de cada variável pode frequentemente levar a condição otimizada enganosa, já que nesta abordagem não considera as possíveis interações entre as variáveis⁶³.

Para o desenvolvimento de um protocolo de imobilização eficiente, é necessário considerar e entender a relação entre todas as variáveis na resposta catalítica. Nesse sentido, o uso de métodos quimiométricos na otimização da imobilização enzimática torna-se mais relevante, especificamente, o uso do planejamento fatorial que é um dos métodos quimiométricos mais simples⁶⁴. O planejamento fatorial tem sido aplicado em diversos campos de pesquisa, com o

objetivo principal de minimizar a tempo gasto no processo de otimização, número de experimentos e, principalmente, estudar os efeitos de interação de duas ou mais variáveis⁶¹.

O uso do planejamento fatorial na imobilização enzimática pode ser completo ou fracionário⁵⁶. O planejamento fatorial completo é preferido quando há um número limitado de variáveis; caso contrário, o número de experimentos se torna impraticável. Por outro lado, adotando planejamento fatorial completo é possível estudar todas as combinações possíveis entre os fatores⁶⁵ abrangendo todas as interações entre as variáveis. Em geral, o planejamento fatorial completo é aplicado quando estuda-se no máximo duas ou três variáveis^{56,64}.

Como alternativa ao planejamento fatorial completo, utiliza-se o planejamento fatorial fracionário. Nesta vertente, para extrair informações sobre as melhores condições, estuda-se as principais combinações entre as variáveis, deste modo, nem todas as combinações são avaliadas, como ocorre no planejamento fatorial completo⁶⁵. Neste design experimental recomenda-se realizar experimentos no ponto central para obter uma boa estimativa de erros, minimizando o risco de perda de relações não lineares e a repetição permite determinar intervalos de confiança. Além disso, é possível estimar um modelo razoável e verificar se há falta de ajuste no sistema⁶⁶.

Sobral et al.⁵⁷ demonstraram a aplicabilidade do planejamento fatorial completo para a imobilização da enzima ciclodextringlycosiltransferase. Os autores aplicaram para fatores qualitativos (suporte e método de imobilização) e a temperatura foi o único fator quantitativo avaliado. Desta forma, foram capazes de selecionar o melhor método de imobilização e o suporte mais eficiente, demonstrando que, mesmo no caso de fatores qualitativos, que não podem ser totalmente explorados, a utilização de cálculos quimiométricos pode orientar experimentos posteriores.

Um planejamento fatorial mais complexo foi feito por Jun e colaboradores⁶⁰ que utilizou o planejamento fatorial com três níveis, em que o

ponto central consistiu no valor médio dos níveis superiores e inferiores de todas as variáveis. Três variáveis de processo de imobilização da enzima peroxidase foram otimizados: pH, carga inicial da enzima e tempo de imobilização. Neste trabalho a metodologia de resposta de superfície (RSM) foi utilizada para analisar e estudar o mecanismo e os fatores que possuem maior influência no processo de imobilização. Utilizando RSM, os autores observaram que o aumento do pH teve um impacto notável na eficiência de imobilização enzimática, mas um aumento expressivo leva à diminuição da eficiência da imobilização. Além disso, os resultados também revelaram que a baixa carga enzimática inicial (0,1U / mL) foi suficiente para cobrir todos os locais porosos na superfície da membrana polimérica.

1.3. Materiais para Suporte

As propriedades das enzimas imobilizadas são resultado da combinação das propriedades do biocatalisador e do suporte⁵⁰. Portanto, a interação (enzima/suporte) fornece um bioconjugado com propriedades bioquímicas e físico-químicas específicas que determinam sua aplicabilidade^{49,50}. O suporte pode ser um polímero orgânico natural (ex. celulose, quitina e colágeno)^{46,50,54,67}, um polímero orgânico artificial (ex. cloreto de polivinil, poliuretano e epóxidos)⁴⁶, um suporte inorgânico (ex. alumina, sílica e zeólitas)^{50,54} ou ainda um material híbrido oriundo da combinação entre um material orgânico e inorgânico⁶⁸.

Para ser aplicado como suporte na imobilização enzimática, o material deve exercer uma mudança conformacional mínima na estrutura do biocatalisador e ser capaz de formar ligações estáveis entre a matriz e a enzima⁶⁸. Além disso, deve haver afinidade entre os grupos funcionais dos dois materiais para permitir interações enzima-suporte e a ligação efetiva da enzima ao suporte no caso da imobilização covalente^{68,69}. Para uma imobilização

eficiente, o suporte deve expor os locais ativos do biocatalisador para facilitar a interação da enzima com o substrato e reduzir as limitações de difusão dos substratos e produtos^{68,70}. As principais características de materiais promissores para uso como suporte na imobilização enzimática estão resumidas na FIGURA 1.4.



FIGURA 1. 4: Principais características dos materiais de suporte utilizados para imobilização enzimática. Fonte: Adaptado de Zdarta et al. (2018)⁶⁸.

Os parâmetros físicos, como tamanho de partícula, tamanho e estrutura do poro e área superficial, também desempenham grande importância na imobilização enzimática⁶⁹ e devem ser avaliados na escolha do material que será usado como suporte, assim como a resistência mecânica^{71,72}, que deve ser suficiente para possibilitar a aplicação do material em diferentes condições sem que ocorra danos ao suporte⁶⁹. Em particular, os suportes inorgânicos tem se destacado por corresponderem as características descritas anteriormente e apresentarem excelente resistência térmica, mecânica e microbiana⁴⁷. Outra

característica importante dos suportes inorgânicos, é a possibilidade de serem modificados quimicamente na sua superfície, permitindo utilizar inúmeras técnicas de imobilização^{47,71}.

Devido ao crescente aumento nas possibilidades de aplicações de enzimas imobilizadas, a descoberta e o estudo de novos materiais, desenvolvidos especialmente para a imobilização enzimática, tem sido o foco de diversas pesquisas^{68,73}. Entre os materiais estudados, materiais nanoestruturados, em diferentes morfologias e tamanhos controlados, tem sido usados na imobilização de enzimas por apresentarem elevada área superficial, que possibilita a imobilização de uma maior carga de proteínas⁷⁴. Outra característica importante dos nanomateriais, é a possibilidade de modificação superficial com diversos grupos funcionais passíveis de aperfeiçoar o processo de imobilização enzimática⁶⁸.

1.3.1. Nanopartículas Magnéticas

Uma das principais preocupações em relação a imobilização enzimática em nanomateriais são os problemas associados a separação do biconjugado do meio ao fim da reação⁶⁸. Dentre as possibilidades de separação estão a filtração e a centrifugação^{50,68}, porém no caso de nanomateriais, a centrifugação é limitada apenas a escala laboratorial e para uma boa filtração as partículas devem ser relativamente grandes, resultando em menor área superficial e problemas de difusão⁵⁰. O uso de materiais magnéticos como suporte para a imobilização enzimática torna essa etapa de separação do biocatalisador mais simples pelo uso de um campo magnético externo^{42,48,74,75}. Os materiais magnéticos podem ser classificados frente a resposta que apresentam quando é aplicado um campo magnético, em que essa classificação se divide em cinco tipos básicos^{76,77}: diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo.

Além da facilidade de separação, quando em escala nanométrica, os materiais magnéticos apresentam alta área superficial^{78,79}, elevada razão superfície/volume e a capacidade dessas nanopartículas de regular a orientação das enzimas nos suportes^{42,79}.Essas nanopartículas podem ser compostas por uma série de materiais⁸⁰, baseados em óxidos metálicos, como óxidos de ferro⁷⁸ e ferritas⁸¹, em metais, como cobalto⁸² e níquel⁸³ e ligas como ferro-platina^{84,85}.Dentre os materiais magnéticos mais utilizados, os óxidos de ferro são promissores para aplicação em imobilização enzimática devido sua abundância⁸⁶, aplicabilidade^{75,87,88} e biocompatibilidade^{80,89}, além da propriedade superparamagnética que ocorre em partículas entre 10 nm e 150 nm de diâmetro, dependendo do material^{76,90}.

As principais fases magnéticas de óxido de ferro são a magnetita (Fe_3O_4) e sua forma oxidada, a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)^{76,91,92}.A magnetita é o material magnético mais antigo do mundo e, à temperatura ambiente, possui uma estrutura cúbica do tipo espinélio invertido (FIGURA 1.5-a)⁹³⁻⁹⁷, contendo íons Fe^{3+} nos sítios tetraédricos (A) e mistura dos íons Fe^{3+} e Fe^{2+} em igual proporção nos sítios com coordenação octaédrica (B)^{92,95}.Ao contrário da magnetita, a maghemita possui apenas íons ferro (III) em sua estrutura⁹⁸ (FIGURA 1.5-b) e a neutralidade da carga na estrutura do $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ é obtida pela formação de vacâncias em alguns sítios octaédricos⁹⁹, cada cela unitária contém o Fe^{3+} distribuído em 8 sítios tetraédricos e 16 octaédricos¹⁰⁰.

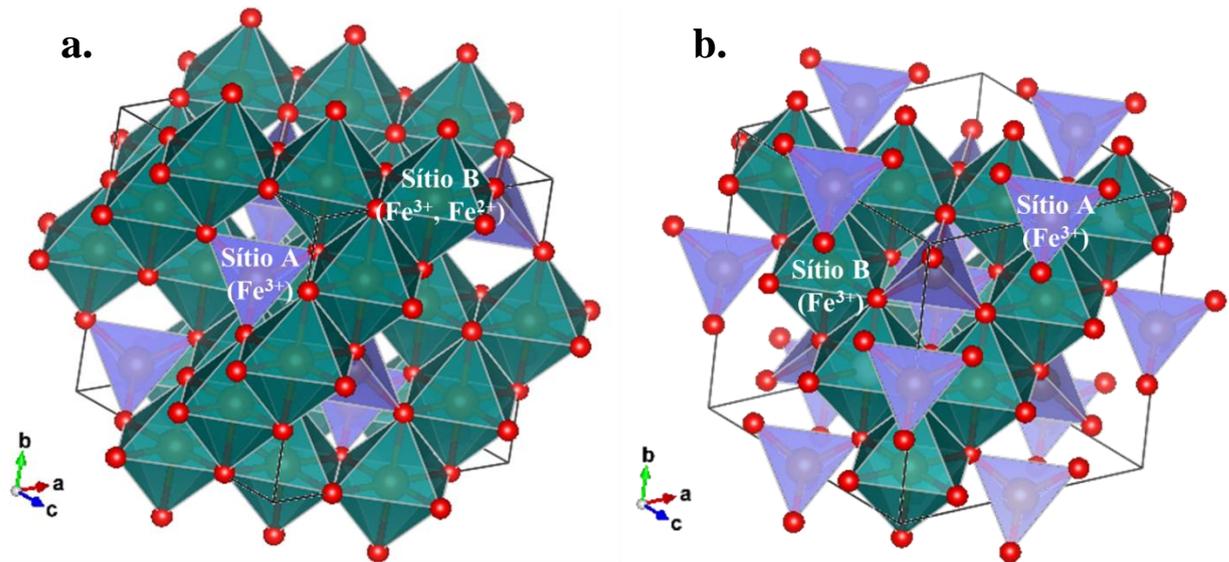


FIGURA 1. 5: Célula unitária da magnetita (a) e da maghemita (b). As esferas vermelhas são os átomos de oxigênio, o poliedro verde mostra o ferro nos sítios octaédricos e o roxo mostra o ferro coordenado tetraedricamente. Fonte: Autoria própria.

Para apresentar o comportamento superparamagnético é aceito que as nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) devam apresentar tamanho menor que 25 nm^{101,102}, enquanto o tamanho crítico para a formação de uma estrutura de múltiplos domínios foi teoricamente estimado em 76nm para nanocubos¹⁰³ e 128nm para nanopartículas esféricas¹⁰⁴. Já para a maghemita, o comportamento superparamagnético se manifesta em nanopartículas menores que 30 nm¹⁰² e o tamanho crítico para a formação de múltiplos domínios é 166 nm para nanopartículas esféricas¹⁰⁴.

1.3.1.1. Nanopartículas Superparamagnéticas

O magnetismo em nanoescala possui grande interesse científico devido as diversas aplicações tecnológicas possíveis¹⁰⁵. Isso porque quando o tamanho das partículas magnéticas é reduzido para algumas dezenas de nanômetros, elas exibem uma série de excelentes propriedades físicas, como magnetoresistência, superparamagnetismo, grandes coercividades, alta

temperatura de Curie e baixa magnetização de saturação, em comparação com os valores dos materiais macroscópicos (*bulk*) correspondentes¹⁰⁶. Uma das propriedades físicas que depende das dimensões do material é o movimento das paredes de domínio magnético (*magnetic domain walls*) responsáveis por separar os domínios magnéticos¹⁰⁷, regiões de constante magnetização em um sólido magnético, e estão relacionados com o superparamagnetismo de nanopartículas magnéticas¹⁰⁴.

O superparamagnetismo é uma forma de magnetismo que surge em pequenas partículas de materiais ferromagnéticos ou ferrimagnéticos¹⁰⁸ e está diretamente relacionado com o tamanho das nanopartículas⁹⁰. Como demonstrado na FIGURA 1.6, em partículas grandes é favorecido energeticamente a formação de paredes de domínio magnético, à medida que o tamanho das partículas diminui a formação de paredes do domínio se torna energeticamente desfavorável^{102,104} e as partículas são consideradas possuindo apenas um monodomínio magnético¹⁰⁹. Com o tamanho das partículas abaixo do valor de monodomínio, os spins são cada vez mais afetados por flutuações térmicas e o sistema se torna superparamagnético^{91,104}.

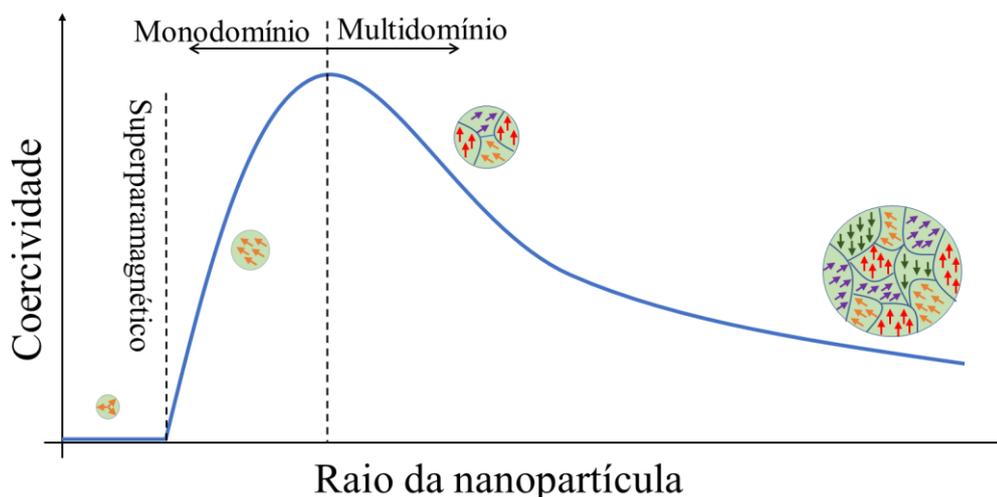


FIGURA 1. 6: Ilustração esquemática da relação tamanho-coercividade de pequenas partículas magnéticas. Fonte: Adaptado de Akbarzadeh et al. (2014)¹¹⁰ e Leslie-Pelecky e Rieke (1996)¹⁰⁴.

Quando um material nanoestruturado se apresenta como superparamagnético, um campo magnético externo é capaz de magnetizá-lo de forma semelhante a materiais paramagnéticos^{102,108}, entretanto, em vez de cada átomo ser independentemente influenciado por um campo magnético externo, em nanopartículas superparamagnéticas o momento magnético dos cristalitos se alinha com o campo magnético¹⁰² e sua suscetibilidade magnética é muito maior^{91,108}. Deste modo, as nanopartículas superparamagnéticas se alinham rapidamente na presença de um campo magnético, resultando em respostas mais rápidas, e após a retirada do campo magnético, essas partículas tem elevados valores de magnetização^{90,91} e não apresentam histerese¹¹¹ (FIGURA 1.7, linha azul), ou seja, não possuem magnetização residual e coercividade insignificante^{102,112}.

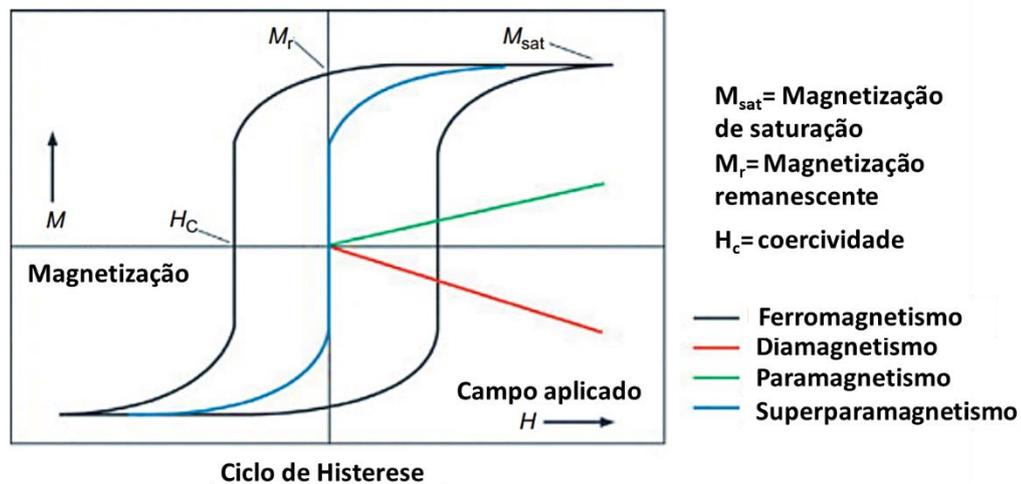


FIGURA 1. 7: Ciclo de histerese (magnetização vs campo magnético aplicado) característicos de nanopartículas ferromagnéticas e superparamagnéticas. Para comparação, também são mostrados comportamentos paramagnéticos e diamagnéticos. Fonte: Adaptado de Arruebo et al. (2007)¹¹² e Chee et al (2018)¹⁰².

Ao acoplar essas propriedades magnéticas com propriedades elétricas e ópticas de materiais nanométricos com o reconhecimento específico ou propriedades catalíticas das biomoléculas, surgiram diversas aplicações

biotecnológicas^{111,113,114}. Porém a instabilidade intrínseca é um problema inevitável relacionado a essas partículas quando armazenadas por certos períodos de tempo¹¹⁵, principalmente nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs –*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*) não recobertas que são propensas a oxidação sob condições ambientais^{115,116}. Várias rotas sintéticas são relatadas para sintetizar nanopartículas magnéticas baseadas em óxido de ferro, FIGURA 1.8, entretanto um dos desafios é conseguir obter nanopartículas com morfologia e distribuição de tamanho adequados, monodisperso e com elevado momento magnético¹¹⁷. Por essas razões, é essencial elaborar estratégias para alcançar a estabilidade das nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, evitando a degradação no curso e após os procedimentos sintéticos¹¹⁵.

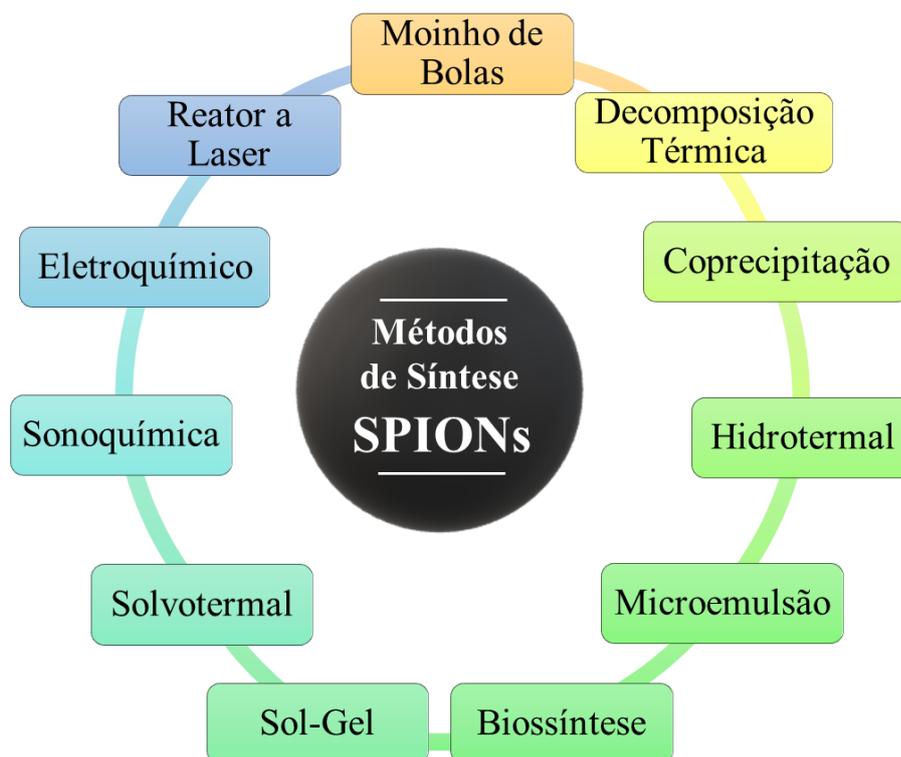


FIGURA 1. 8: Ilustração esquemática mostrando os vários métodos de síntese de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. Fonte: Sodipo et al. (2016)¹¹⁷.

Dentre os métodos descritos, a coprecipitação é um dos métodos de síntese mais usados e citados na literatura devido as diversas vantagens associadas a esse método¹¹⁷, como a utilização de condições ambientes e a possibilidade de utilização para produção de SPIONs em larga escala. Entretanto, a principal desvantagem desse método é o controle de tamanho e o difícil controle de morfologia¹¹⁸, além da necessidade de se utilizar atmosfera inerte durante a síntese para evitar a oxidação do precursor de Fe (II)¹¹⁹. Frente a coprecipitação, o método solvotermal apresenta algumas vantagens como, por exemplo, bom controle de tamanho e morfologia, além da elevada cristalinidade das nanopartículas¹²⁰ que pode influenciar na melhora da resposta magnética da mesma, porém o grande desafio desta técnica é a síntese de partículas magnéticas com tamanho de ≈ 20 nm não aglomeradas¹²¹. Para contornar a tendência de aglomeração das nanopartículas magnéticas e torná-las mais estáveis, tem sido utilizado diferentes estratégias para funcionalizar sua superfície, como a utilização de surfactantes, estabilizantes e polímeros^{119,122}.

1.4. Nanopartículas plasmônicas

Apesar da nanociência parecer ser um novo campo de pesquisa das últimas décadas, a síntese de nanopartículas metálicas tem sido realizada desde há muito tempo¹²³. O caso mais famoso é a taça de *Lycurgus*, datada por volta século 4 d.C., que exhibe interessante mudança de cor, utilizando ouro coloidal (nanopartículas de ouro) e nanopartículas de prata¹²⁴. O vidro do copo é dicróico, em luz direta ele se assemelha ao jade com um tom amarelo-esverdeado opaco, mas quando a luz brilha através do vidro (luz transmitida) muda para uma cor rubi translúcida¹²⁵ (FIGURA 1.9). As nanopartículas são responsáveis pela mudança na coloração, o ouro é responsável pela transmissão avermelhada^{125,126} e as nanopartículas de prata pela reflexão esverdeada¹²⁵.

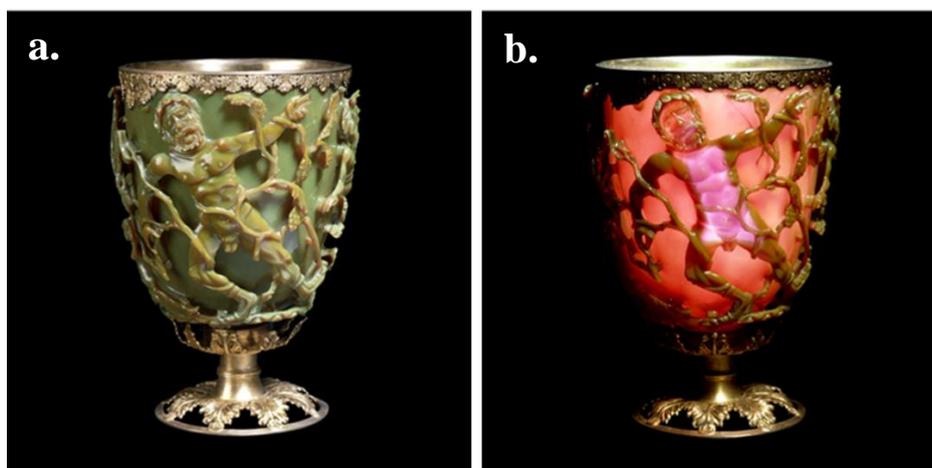


FIGURA 1. 9: Taça de *Lycurgus* em luz refletida (a) e transmitida (b). Fonte: FREESTONE et al. (2007)¹²⁵.

A coloração vermelha das nanopartículas de ouro também foi usada no período medieval para dar cor a vários vitrais de Igrejas (FIGURA 1.10-a) e, mais comumente, manchas amarelas contendo nanopartículas de prata também foram produzidas¹²³, não só em vitrais, as nanopartículas de ouro também foram usadas como pigmentos no esmalte rosa característico da porcelana *Famille-Rose* (FIGURA 1.10-b) durante a dinastia Qing¹²⁷.



FIGURA 1. 10: Vitral da *Sainte-Chapelle* em Paris (a) e um exemplo de porcelana *Famille-Rose*: o vaso *Mille Fleurs* (b). Fonte: SCHAMING et al. (2015)¹²³.

A mudança na coloração das nanopartículas metálicas é causada pela oscilação coletiva dos elétrons da banda de condução induzida pela radiação eletromagnética incidente, fenômeno conhecido como ressonância plasmônica de superfície¹²⁸, demonstrado esquematicamente na FIGURA 1.11. Esta propriedade somente é vista quando as nanopartículas metálicas de ouro estão em domínio nanométrico. Como consequência da elevada área superficial, as nanopartículas apresentam também propriedades dependentes da sua relação área/volume¹²⁹, assim, em comparação com as oscilações plasmônicas em massa nos metais, a ressonância plasmônica de superfície é deslocada para energias mais baixas e são determinadas pelos parâmetros físicos do sistema: o tamanho, a forma e o material da nanopartícula, bem como o índice de refração do meio onde elas se encontram¹²⁸.

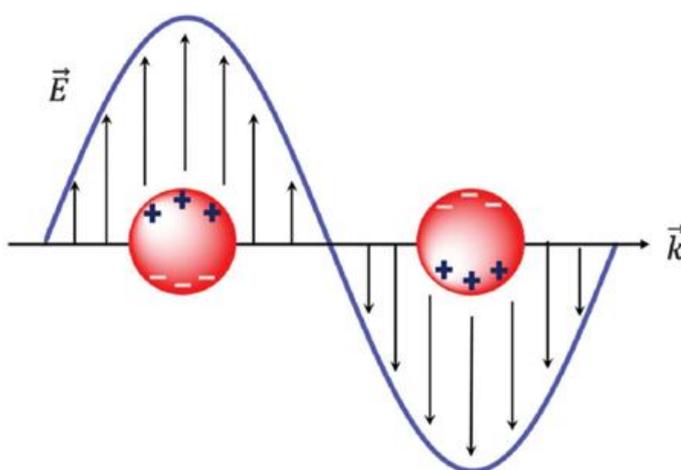


FIGURA 1. 11: Representação da ressonância plasmônicas de superfície para uma nanopartícula esférica. Fonte: OLSON et al.(2015)¹²⁸.

O efeito plasmônico é definido como a oscilação coletiva dos elétrons da banda de valência para a banda de condução das nanopartículas metálicas quando excitadas por uma onda eletromagnética de luz visível¹³⁰. Essas nanopartículas excitadas afetam o campo eletrônico local¹³¹. Deste modo, as nanopartículas plasmônicas podem ser utilizadas para melhorar a sensibilidade de biossensores enzimáticos¹³². Os plasmons de superfície excitados podem ter

basicamente três mecanismos de relaxamento¹³³, como mostrado esquematicamente na FIGURA 1.12. Através da reemissão radiativa da energia eletromagnética (espalhamento elástico), que ocorre apenas em ambientes inertes, pela interação de plasmons de superfície excitados com adsorbatos aceitadores de elétrons e através do amortecimento não radioativo de Landau, que resulta na absorção não radiativa dentro da nanopartícula, causando aquecimento local.



FIGURA 1. 12: Representação esquemática dos mecanismos de relaxamento de plasmons de superfície. (1) Reemissão radiativa; (2) Interação dos plasmons com adsorbatos e (3) Amortecimento de Landau (aquecimento). Fonte:

Adaptado de Kim et al. (2016)¹³³.

O efeito fototermal das nanobastões de ouro em enzimas imobilizadas para a utilização em sistemas catalíticos foi estudado previamente por Tadepalli et al.⁶. Os autores observaram uma melhora em 110% na atividade biocatalítica de enzimas peroxidases imobilizada em um polímero multicamada de sílica orgânica frente a um ensaio catalítico modelo. Outro trabalho também desenvolvido pelo grupo de Tadepalli¹³⁴, investigou a atividade catalítica de peroxidases imobilizadas em nanobastões de ouro encapsulado em *Metal-Organic Frameworks*. Neste trabalho alcançaram uma melhora de 80% na atividade catalítica da enzima, mostrando que mesmo com a modificação do suporte, conversões catalíticas superiores são alcançadas na presença de nanoestruturas

plasmônicas. Outra possibilidade de uso de nanoconjugados plasmônicos foi demonstrado por Li e colaboradores¹³⁵ que conseguiram controlar remotamente a catalise enzimática pela modificação da potência do laser incidido sobre os nanoconjugados.

As nanopartículas de ouro (AuNPs) podem ser sintetizadas por dois métodos básicos de preparação: métodos *Top-Down* e *Bottom-Up*¹³⁶. O método *Top-Down* parte da redução do material bulk para a obtenção das nanopartículas e o método *Bottom-Up* faz a síntese partindo-se de reagentes moleculares à estrutura nanométrica^{136,137}, como representados na FIGURA 1.12. Tipicamente, os métodos *Bottom-Up* são preferidos devido à possibilidade de obter partículas menores, com melhor controle sobre o tamanho das mesmas, forma e também sobre a distribuição de tamanho¹³⁷. Como consequência da redução de tamanho das partículas, na síntese das nanopartículas metálicas é necessário à utilização de suportes ou agentes superficiais (agentes de cobertura) para inibir/impedir a aglomeração e o crescimento excessivo das mesmas¹¹⁰.

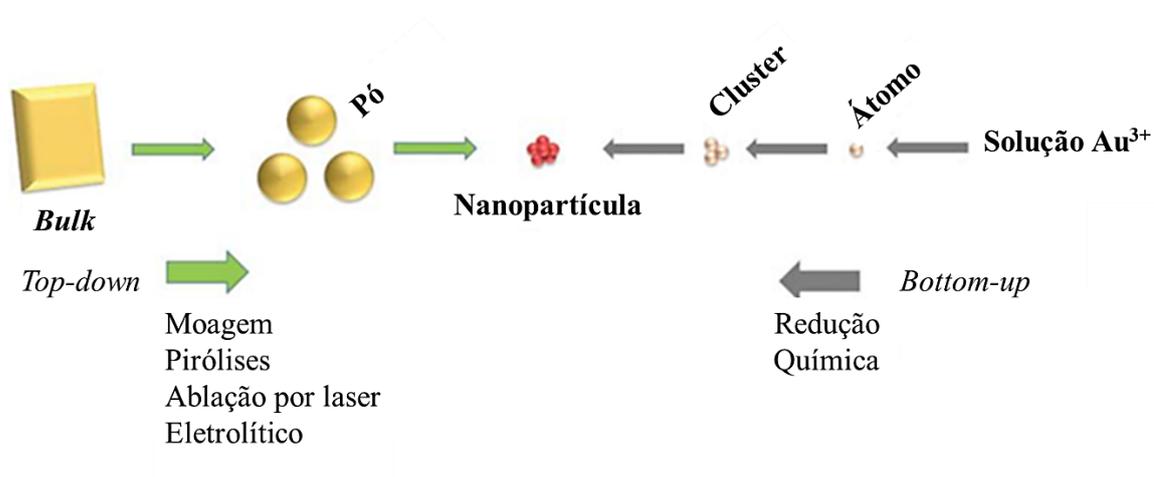


FIGURA 1. 13: Representação esquemática dos métodos básicos de preparação de nanopartículas metálicas. Fonte: ALEX et al.(2015)¹³⁶.

2. OBJETIVOS

Com base no cenário apresentado, o objetivo deste trabalho foi de sintetizar nanopartículas de magnetita superparamagnéticas (menor que 25 nm), recobri-las com SiO₂, funcionalizá-las e utilizá-las como suporte para a imobilização da enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens*, estudando sua atividade na presença de nanopartículas plasmônicas frente a reação de hidrólise seguido da esterificação do óleo de soja e hidrólise de óleo de oliva como reações modelo.

Neste contexto, os objetivos específicos são:

- i. Estudar a influência de diferentes estabilizantes na síntese das nanopartículas, avaliando o tamanho e os parâmetros cristalinos das mesmas;
- ii. Avaliar dois métodos de recobrimento com SiO₂ das nanopartículas magnéticas e investigar a funcionalização com grupos amino;
- iii. Aplicar o planejamento fatorial para otimização dos parâmetros de imobilização enzimática, englobando o maior número de variáveis possíveis;
- iv. Estudar a atividade da enzima lipase imobilizada nos suportes magnéticos, utilizando diferentes proporções de substrato/bioconjugado e diferentes acil receptores frente a reação de formação de ésteres alquílicos de ácido graxo;
- v. Investigar a reutilização do suporte magnético para imobilização do biocatalizador;
- vi. Avaliar o comportamento das enzimas imobilizadas quando na presença de nanopartículas plasmônicas de ouro com diferentes morfologias, afim de estudar o efeito fototermal das nanopartículas na atividade hidrolítica da enzima lipase.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Para o preparo das soluções aquosas e tampões foi utilizado água ultrapura (18,2 M Ω cm), purificada em sistema de purificação Milli-Q® Gradiente da Millipore.

Os reagentes que foram utilizados estão listados na **Tabela 2** com suas especificações (marca e pureza).

TABELA 3.1: Especificações dos reagentes utilizados

Reagente/Solvente	Marca	Pureza
(3-Aminopropil)trimetilsilano (C ₉ H ₂₃ NO ₃ Si)	Sigma-Aldrich	97%
1-Bromodecano [CH ₃ (CH ₂) ₉ Br]	---	---
1-Metilimidazol (C ₄ H ₆ N ₂)	Sigma-Aldrich	99,0%
Acetato de Cobre (II) Monohidratado [Cu(CH ₃ COO) ₂ .H ₂ O]	---	99,0%
Acetato de Sódio P.A. (NaC ₂ H ₃ O ₂)	Synth	99,0 %
Acetona P. A.	---	99,5 %
Ácido Acético Glacial (CH ₃ COOH)	Neon	98,8%
Ácido Clorídrico P.A. (HCl)	Synth	36,5 – 38,0 %
Ácido Fosfórico P.A. (H ₃ PO ₄)	Synth	---
Ácido Nítrico P.A (HNO ₃)	Synth	65,0 %
Ácido Oleico (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	Sigma-Adrich	99,0%
Ácido Sulfúrico P.A (H ₂ SO ₄)	Applichem	96%

Ácido Tetracloroauríco (III) (HAuCl ₄)	Êxodo Científica	50,0-51,0 % baseado em Au
Álcool Etílico P. A.	Synth	99,5 %
Álcool Metílico P.A.	Neon	99,8%
Amano Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Sigma-Aldrich	---
Borato de Sódio P.A (Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O)	Reagen	---
Brometo de Cetiltrimetilamônio – CTAB [CH ₃ (CH ₂) ₁₅ N(Br)(CH ₃) ₃]	Merck	98,0 %
Citrato de Sódio P.A. (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇)	Neon	99%
Cloreto de Ferro (III) Hexahidratado (FeCl ₃ .6H ₂ O)	Synth	97,0-102,0 %
Cloridrato de cisteamina (2-mercaptoetilamina)	Sigma-Aldrich	98,0%
Clorofórmio Deuterado (CDCl ₃)		99,8%
Etilenoglicol P.A.	Synth	99,5 %
Fosfato de Potássio Dibásico P.A. (Na ₂ H ₂ PO ₄)	Synth	98,0%
Fosfato de potássio monobásico P.A. (NaH ₂ PO ₄)	Synth	99,0%
Glutaraldeído	Sigma-Aldrich	25% em H ₂ O
Hidrazina (N ₂ H ₄)	AcrosOrganics	64,0%
Hidróxido de Amônio (NH ₄ OH)	Synth	28% em NH ₃
Hidróxido de Sódio (NaOH)	Quemis	97,0%
Nitrato de Prata (AgNO ₃)	Neon	99,8 %
Piridina (C ₅ H ₅ N)	---	---

Reagente de Bradford	Sigma-Aldrich	---
SDS (NaC₁₂H₂₅SO₄)	Synth	90,0%
Tetraetilortosilicato – TEOS (SiC₈H₂₀O₄)	Sigma-Aldrich	98,0%
Tolueno P.A.	Neon	99,0%

3.2. Instrumentação

Os volumes de amostra e soluções utilizados foram medidos utilizando-se micropipetas Labmate-Pro com ponteiros descartáveis (2-20 µL, 20-200 µL e 100-1000 µL). As pesagens foram feitas em uma balança analítica e medidas de pH um potenciômetro da Tecnocon modelo MPA-210.

A curva analítica e o monitoramento da degradação foram feitos em um espectrofotômetro UV-Vis Cary Varian, equipado com uma lâmpada de xenônio com divisor de feixes e uma célula de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm.

As análises de RMN foram registradas à 298 K, usando TMS como padrão interno e clorofórmio-d(CDCl₃) como solvente em um espectrômetro BRUKER, modelo Avance III, 9.4 Tesla 400 MHz para frequência do hidrogênio, NanoBay, equipado com trocador automático de amostra e sonda de 5 mm BBO (smartprobe com ATMA®).

Os espectros de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das amostras em KBr foram registrados na faixa de 4.000 a 400 cm⁻¹ em um espectrômetro Bomem-Michelson 102. Os espectros foram adquiridos preparando uma pastilha das amostras em KBr, na proporção 1:100 (m:m) com 64 scans e resolução de 2 cm⁻¹, utilizando KBr como branco.

Foi utilizado um analisador elementar CHNS-OFisons, tipo EA-1108, ThermoScientific com o auxílio de uma microbalança Sartorius Micro,

modelo XM-1000 P, operado pela técnica Luciana Vizotto, utilizando como padrão a sulfanilamida.

As medidas de difração de raios-X de pó (DRX) foram feitas utilizando um difratômetro Shimadzu modelo XRD6000 com radiação de Cu ($K\alpha=1,5418 \text{ \AA}$) e os dados foram coletados na faixa de $10-80^\circ 2\theta$. A morfologia dos materiais foi estudada usando um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução, em que as amostras foram dispersas em foram dispersas em isopropanol, sonicadas por 30 min e depositadas em uma placa de silício (*Sichips*) sobre um porta amostra metálico (*Stub*). O programa utilizado para indexação da fase cristalina foi X'PertHighScore.

Para a obtenção das imagens de micrografias utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura de alta resolução com fonte de emissão de campo, *Field Emission Gun*, (MEV-FEG) modelo FEI InspectF50.

As imagens de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) foram adquiridas no microscópio de transmissão eletrônica MET JEOL JEM 2100, Canhão com filamento LaB_6 e Tensão de aceleração 200 kV. As amostras foram preparadas dispersando 1 mg de sólidos em 10 mL de água ultrapura sob ultrassom por 20 min. Após esse tempo, 10 μL da suspensão aquosa de nanopartículas foram depositados sobre um Grid (Ted Pella, Ultrathin C Type-A 400 mesh, Cu) e o excesso de líquido foi absorvido com papel de microscopia após 1 minuto (técnica de blotting) e então secas em condições ambientes.

3.3. Metodologia

A metodologia descrita a seguir foram feitas de acordo com o esquema representado na FIGURA 3.

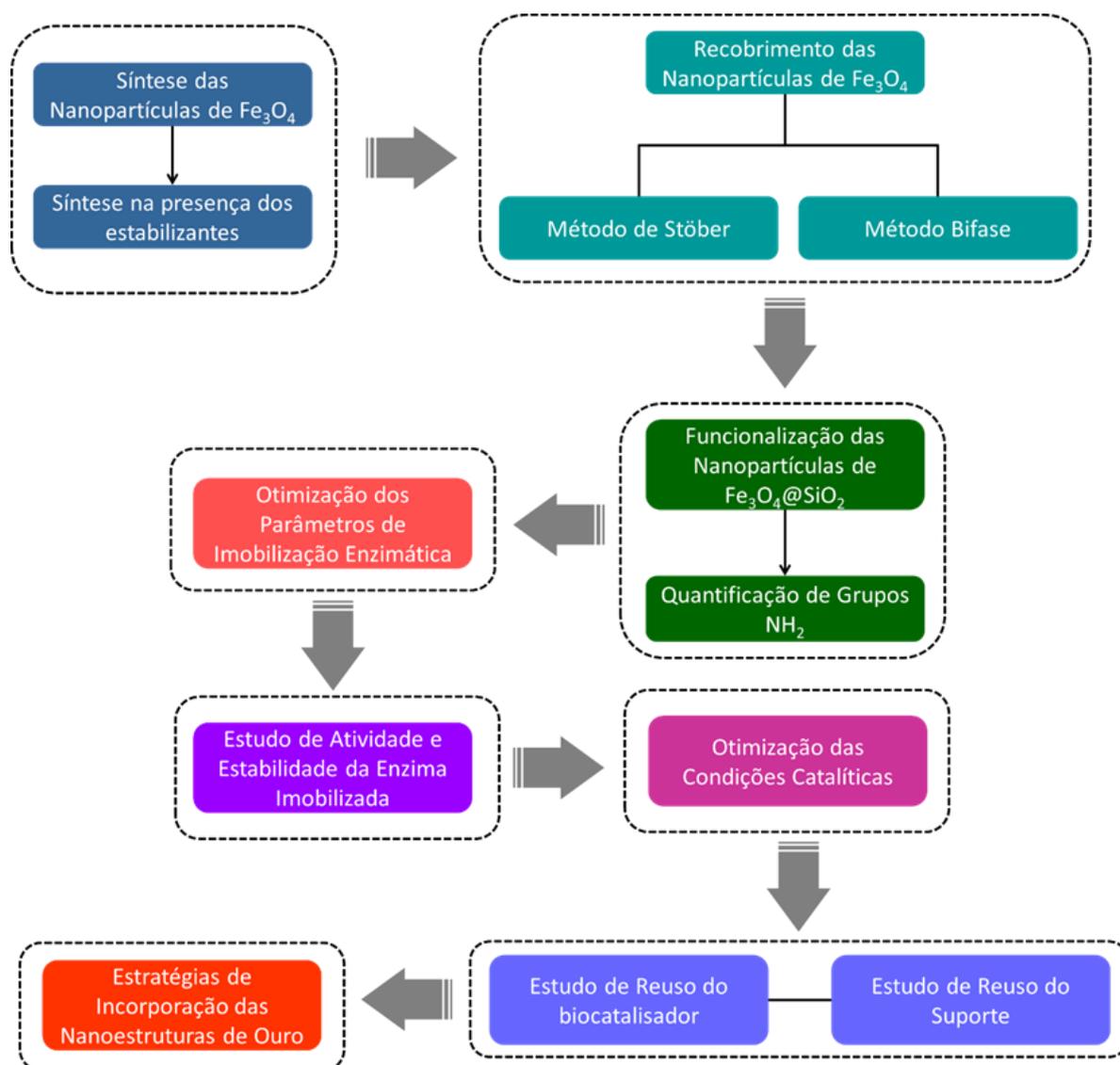


FIGURA 3. 1: Representação esquemática da ordem de realização dos experimentos.

3.3.1. Síntese do Estabilizante Catiônico

Previamente a síntese das nanopartículas magnéticas, foi sintetizado um estabilizante alquilimidazólio catiônico, que posteriormente, foi usado na síntese das nanopartículas magnéticas pelo método solvotermal. O brometo de 1-Decil-3-metilimidazólio (ImC₁₀), foi preparado semelhante a síntese descrita por Vanyúr e colaboradores¹³⁸, no qual se reagiu 0,5 M de 1-metilimidazol com 0,5 M de 1-Bromodecano em tolueno por 24 horas a 80 °C. Ao final da síntese, o produto foi recristalizado em tolueno gelado e avaliado sua pureza através da

técnica de ressonância magnética nuclear de ^1H utilizando como solvente clorofórmio deuterado (CDCl_3).

3.3.2. *Síntese das Nanopartículas Magnéticas*

Diferentes nanopartículas foram sintetizadas pelo método solvotermal: sem a presença de estabilizantes e na presença de diferentes estabilizantes. Os estabilizantes catiônico e zwitteriônico utilizados, são surfactantes alquilimidazólicos, que possuem a capacidade de estabilizar a nanopartícula por interação eletrostática e/ou pela estabilização estérica, através da adsorção das moléculas na superfície do material¹¹⁰; o estabilizante aniônico utilizado foi o citrato de sódio, que pode complexar com o íon metálico superficial¹³⁹, podendo também estabilizar as nanopartículas.

3.3.2.1. *Síntese solvotermal sem estabilizante*

A síntese das nanopartículas superparamagnéticas foi baseada na síntese de Chen e colaboradores¹⁴⁰. Para isso, 3,703 g (13,7 mmol) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram adicionados em um recipiente de teflon de 100 mL e dissolvidos em 9 mL de etilenoglicol, em seguida, 3,601g (43,9 mmol) de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ foram adicionados e deixado sobre agitação magnética por 30min. a 50 °C. Posteriormente, a mistura foi transferida para um reator autoclave em aço inoxidável (*stainless steel autoclave*) e levada ao forno a 200 °C por 14 horas com rampa de aquecimento de 10 °C/min e resfriamento a temperatura ambiente.

As partículas obtidas foram lavadas em triplicata com 60 mL de água destilada e com 60 mL de álcool etílico aquecido a 50 °C.

3.3.2.2. *Síntese solvotermal com estabilizantes*

A síntese na presença de diferentes estabilizantes foi feita com a finalidade de evitar aglomeração das nanopartículas. Para tanto, nas mesmas condições descritas anteriormente foi adicionado 500 mg do estabilizante catiônico, brometo de 1-Decil-3-metilimidazólio, previamente sintetizado. Foi utilizado também outro estabilizante alquilimidazólio, brometo de 1-Decil-3- (3-sulfonatopropil)imidazólio, sintetizado pelo grupo¹⁴¹, em que atua como um estabilizante zwitteriônico (ImSC₁₀). Para tal, utilizou-se na mesma proporção, em massa, do estabilizante catiônico.

Para a síntese utilizando o estabilizante aniônico comercial, o citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇), manteve-se as mesmas condições e proporções dos da etapa 3.3.2.1 e a para a proporção de citrato baseou-se na síntese descrita por Luo et al.¹⁴², no qual, para 13,7 mmol de FeCl₃.6H₂O foram adicionados 5,47 mmol(1,413 g) de Na₃C₆H₅O₇.

As estruturas dos estabilizantes utilizados estão representados na figura abaixo juntamente com a abreviação utilizada para identificação dos mesmos.

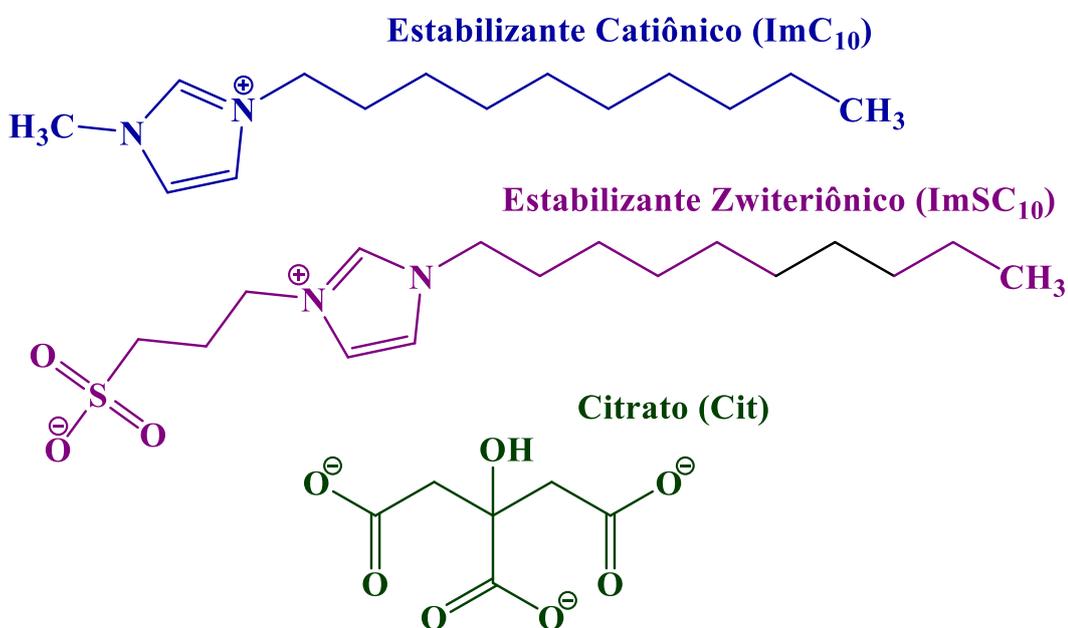


FIGURA 3. 2: Estrutura dos estabilizantes inseridos na síntese solvotermal.

3.3.3. Recobrimento das Nanopartículas de Fe₃O₄

Para evitar que as nanopartículas sejam oxidadas durante a sua utilização e armazenamento¹¹⁵, foram avaliados dois diferentes métodos de recobrimento com SiO₂; o método de Stöber, mais utilizado, e o método Bifase, em que as gotículas de tetraetilortosilicato (TEOS), insolúveis em água, formam duas fases com o meio reacional aquoso.

3.3.3.1. Método Stöber

Para o recobrimento pelo método Stöber utilizou-se a metodologia descrita por Ta et al.¹⁴³, no qual 40 mg de Fe₃O₄ foram suspensas em uma mistura de pH ≈ 11 constituída de 16,8 mL de água destilada, 64 mL de etanol e 4 mL de NH₄OH. Essa suspensão foi sonificada por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, adicionou-se 0,4 mL de TEOS, gota a gota, e deixou-se em agitação mecânica por 4 horas. As nanopartículas recobertas (Fe₃O₄@SiO₂) foram lavadas com água destilada e etanol e secas a vácuo.

3.3.3.2. Método Bifase

A síntese pelo método bifase foi feita de acordo com o procedimento descrito por Zou et al.¹⁴⁴ Para isso, 50 mg de Fe₃O₄ foram adicionados em 100 mL de água Milli-Q seguido da adição de 0,63 mL de hidrazina 64% como base para catalisar a reação de hidrólise do TEOS. A suspensão foi sonificada por 10 minutos a adicionado 0,4 mL de TEOS. A mistura foi então agitada, utilizando um agitador mecânico, a 90 °C por 2 horas. As nanopartículas recobertas foram lavadas com água Milli-Q e etanol, respectivamente, e seco a vácuo.

3.3.4. Funcionalização das Nanopartículas de Fe₃O₄@SiO₂

A funcionalização da superfície das nanopartículas foi baseado na metodologia descrita por Netto e colaboradores¹⁴⁵. Previamente a funcionalização, retirou-se o excesso de água das nanopartículas. Para isso, 100 mg das nanopartículas recobertas foram suspensas em 20 mL de uma mistura azeotrópica de metanol e tolueno 1:1 (v:v). Essa mistura foi aquecida a 95°C até que o volume alcance 50% do volume inicial, em atmosfera inerte. Ao alcançar 50% do volume inicial adicionou-se 10 mL de metanol. Este procedimento foi repetido 3x, garantindo que toda água seja retirada juntamente com o metanol. Após a retirada de água e do metanol, adicionou-se o (3-Aminopropil)trimetilsilano (APTES) (0,2 mL/mg_{nanopartícula}) à suspensão de nanopartículas em tolueno e deixou-se em refluxo a 110 °C por 12 horas. Em seguida, as nanopartículas foram lavadas com 10 mL de metanol e 10 mL de etanol, sucessivamente, e secas a vácuo.

3.3.5. Densidade de Grupos Amina

A densidade de grupos amina foi estimada utilizando a metodologia descrita por Bruce e Sen¹⁴⁶. Para tanto, 5 mg de nanopartículas funcionalizadas foram transferidas para um microtubo de plástico de 2,0 mL, em seguida, essas nanopartículas foram lavadas com 1 mL da solução de acoplamento [0,8% (v/v) de ácido acético glacial em metanol seco], esse processo foi repetido 4x para garantir que não tenha água adsorvida na superfície das nanopartículas. Após a lavagem, adiciona-se 1 mL da solução de 4-benzaldeído (7 mg em 10 mL da solução de acoplamento), deixa-se 3 horas com agitação suave para que a reação entre o 4-benzaldeído e os grupos amina ocorra.

Com o fim das 3 horas, retirou-se o sobrenadante e lavou-se as nanopartículas com 1 mL da solução de acoplamento (4x), em sequência, adicionou-se 1 mL da solução de hidrólise (75mL de H₂O, 75 mL de metanol e 0,2 mL de ácido acético glacial) e o tubo foi agitado em shaker a 600 rpm por 3

horas. Por fim, removeu-se o sobrenadante e acompanhou-se sua absorvância em 282 nm. A concentração de 4-nitrobenzaldeído no sobrenadante foi estimada utilizando uma curva analítica.

3.3.6. Estudo da Reação de Obtenção de Ésteres Metílico de Ácido Graxo

Para estudo do bioconjugado enzimático utilizou-se como reação modelo a obtenção de ésteres de ácido graxo a partir do óleo de soja, que pode ser feito basicamente por duas vias, pela hidroesterificação e/ou transesterificação. Desta forma, previamente a quimiometria foram avaliadas as melhores condições catalíticas para prosseguir com os estudos quimiométricos.

Nesta etapa, as condições adotadas para a imobilização enzimática foram as condições do ponto central, utilizado na quimiometria:

- i. Concentração de enzima lipase: 0,75 mg mL⁻¹;
- ii. Massa de nanopartícula magnética: 10 mg;
- iii. pH de imobilização: 7,0;
- iv. Concentração de agente reticulante: 10 µL, solução de glutaraldeído 25% H₂O;
- v. Tempo de Imobilização: 30 min.

Foram estudados, diferentes concentrações de água no meio reacional. Para isto utilizou-se 250 µL de óleo de soja e o metanol na proporção molar 1:4, adicionados em quatro etapas. Todas as catálises foram estudadas em 24 horas de reação e utilizou-se as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante catiônico (Fe₃O₄-ImC₁₀@SiO₂-NH₂).

3.3.7. Imobilização Enzimática

Para os estudos da imobilização enzimática optou-se pela utilização de métodos quimiométricos. Na tentativa de englobar o maior número de variáveis possíveis fez-se um planejamento fatorial fracionado, que possibilita estudar um número maior de variáveis sem tornar-se inviável pelo número de experimentos a serem realizados. Foi avaliado a influência de cinco variáveis:

- i. Concentração de enzima lipase: [Lipase];
- ii. Massa de nanopartícula magnética;
- iii. pH de imobilização;
- iv. Concentração de agente reticulante: [Glutaraldeído];
- v. Tempo de Imobilização.

3.3.7.1. Planejamento Fatorial Fracionário 2^{5-2}

O planejamento fatorial teve como objetivo identificar as variáveis de maior influência na resposta avaliada. Cada variável foi avaliada em dois níveis, nível superior (+), valor máximo estudado, e o nível inferior (-), valor mínimo estudado. Além do limite superior e inferior, fez-se uma triplicata no ponto central (0), considerando o valor mediano entre o limite superior e inferior de cada variável. Todos os experimentos quimiométricos, com exceção do ponto central, foram feitos sem a realização de réplicas.

As variáveis avaliadas e os limites inferiores e superiores estão apresentados na tabela abaixo.

TABELA 3. 2: Condições experimentais avaliadas no planejamento fatorial fracionário.

<i>Variável</i>	<i>Limite Superior</i> (+)	<i>Limite Inferior</i> (-)	<i>Valor do ponto central (0)</i>
<i>[Lipase] / mg mL⁻¹</i>	1,0	0,5	0,75
<i>Massa de NPs / mg</i>	15,0	5,0	10,0
<i>pH</i>	10,0	4,0	7,0

<i>[Glutaraldeído] / μL</i> <i>(solução 25% H_2O)</i>	25,0	5,0	15,0
<i>Tempo / min.</i>	60,0	10,0	35,0

Nesta etapa a resposta avaliada foi reação de transesterificação/hidroesterificação do óleo de soja. A reação foi monitorada por ^1H RMN. Os tampões utilizados foram: acetato 0,1 M para pH 4, fosfato 0,1 M para pH 7 e borato 0,1 M para pH 10. Para comparação e confiabilidade dos resultados obtidos pelos cálculos quimiométricos, durante a quimiometria utilizou-se a mesma massa de bioconjugado (enzima+suporte). Para isso após a imobilização a enzima imobilizada foi seca, em bomba de alto vácuo, e 4 mg do bioconjugado foi utilizado nas catalises.

3.3.7.2. *Otimização do pH de Imobilização*

O pH de imobilização foi avaliado em uma faixa de pH próximo ao limite inferior avaliado na quimiometria. Os valores de pH estudados foram 3,0, 4,0, 5,0. Nos valores de pH 4 e 5 foram usados tampões acetato 0,1 M e para o pH 3 utilizou tampão fosfato 0,1 M, considerando seu primeiro pKa. Para os demais parâmetros de imobilização foi considerado os resultados quimiométricos mais adequado para cada nanopartícula.

3.3.7.3. *Estudo de Atividade e Estabilidade da Enzima Imobilizada*

Os estudos de atividade e estabilidade da enzima livre e imobilizada foram avaliados frente a hidrólise do óleo de oliva comercial. A hidrólise do azeite de oliva foi feito baseado na metodologia descrita no boletim técnico da Sigma-Aldrich¹⁴⁷. Em que se adicionou 400 μL do óleo de oliva na solução avaliada. A

reação de hidrólise foi feita no tempo de 1 hora a 37 °C a 200 rpm. Para estimar a atividade utilizou-se uma solução da enzima livre com concentração de 1 mg mL⁻¹ e para a enzima imobilizada utilizou-se uma suspensão do bioconjugado na concentração de 15 mg mL⁻¹. Ambas as soluções foram feitas em tampão fosfato 0,1 M pH 8.

Para a avaliação da estabilidade térmica preparou-se 2 mL de solução do bioconjugado com concentração de 7,5 mg mL⁻¹ em tampão fosfato pH 8 (0,1 M). Dessa solução foram retiradas alíquotas de 400 µL nos tempos de 0, 10, 30, 60 e 90 minutos após o início da incubação a 45 °C. Este procedimento também foi feito com a enzima livre para comparação da desativação térmica. As condições da reação de hidrólise seguiram-se os parâmetros descritos previamente.

Para quantificação dos ácidos graxos utilizou-se a adaptação do método colorimétrico de Lowrye-Tinsley (1976)¹⁴⁸, em que se adicionou 100 µL do meio reacional em 1 mL de hexano, em seguida, adicionou-se 1 mL da solução de acetato de cobre-piridina (5% m/v), agitou-se vigorosamente para mistura das fases formadas e deixou-se reagir por 10 min., por fim é formado uma mistura bifásica e é feita a leitura do sobrenadante orgânico em um espectrofotômetro UV-Vis. A solução de cobre foi preparada solubilizando o sal de acetato de cobre em água ultrapura e o pH da solução foi ajustado para 6 utilizando piridina. Para a quantificação de ácido graxo formado, utilizou-se uma curva analítica construída utilizando ácido oleio como padrão.

Uma unidade de atividade da lipase foi definida como 1,0 µmol de ácido graxo livre liberado por minuto¹⁴⁹⁻¹⁵² e reportado como U mL⁻¹. A partir desta etapa as enzimas imobilizadas não foram secas, já que foi observado perda da atividade enzimática quando secas em alto vácuo, e a após a imobilização, o bioconjugado foi lavado com tampão fosfato pH 8, pH ótimo da enzima utilizada segundo informações do produto.

3.3.8. Otimização das Condições Catalíticas

Posteriormente à otimização da imobilização enzimática fez-se a otimização das condições catalíticas. A quantidade de óleo de soja foi avaliada (150-500 μL) para a obtenção de melhores conversões. Investigou-se também a melhor conversão frente a diferentes substratos acil receptores, metanol e etanol. Para isso adicionou-se o etanol na proporção molar 1:4, em 3 etapas de adição.

Por fim avaliou-se diferentes temperaturas na conversão do óleo de soja a ésteres de ácido graxo. As temperaturas avaliadas foram 37, 47 e 57 °C. A temperatura de catálise foi avaliada para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$. As otimizações foram feitas considerando as condições otimizadas na imobilização enzimática.

3.3.9. Reciclagem do Biocatalisador Imobilizado

Nos estudos de reuso do bioconjugado, investigou-se frente a reação de conversão do óleo de soja a FAME. Foram estudados até 5 ciclos de reuso e no fim de cada ciclo os bioconjugados foram lavados com 0,5 mL de Hexano. As condições reacionais para o reuso do biocatalisador imobilizado foi 37°C, 250 μL de óleo de soja e o acil receptor utilizado foi o metanol na proporção 1:4.

3.3.10. Reuso do suporte

Para os estudos de reutilização do suporte, fez-se ciclos de imobilização e desprendimento da enzima em um mesmo suporte. Neste sentido, imobilizou-se a enzima nos suportes magnéticos em diferentes em diferentes ciclos, avaliando a eficiência do bioconjugado frente a hidrólise do óleo de oliva. Na imobilização enzimática empregou-se os parâmetros otimizados pela

quimiometria. Para o desprendimento da enzima suspendeu-se 15 mg do bioconjugado em 1 mL da solução de hidrólise, composta de metanol:água:ácido acético glacial (1:1:0,3). O desprendimento da enzima foi realizado em banho ultrassônico. A liberação da enzima do suporte foi monitorada de forma qualitativa pelo método de Bradford e por FTIR.

3.3.11. Síntese das nanopartículas de ouro

Foram utilizadas duas metodologias para síntese de nanopartículas de ouro, para obtenção de diferentes morfologias (esférica e nanobastões), através da aplicação de diferentes estabilizantes. Ambas as metodologias adotadas foram baseadas no *bottom-up* para a produção das nanopartículas.

3.3.11.1. Síntese das Nanopartículas Esféricas de Ouro (AuNP)

Para a síntese das nanopartículas esféricas adotou-se a metodologia de Bastús e colaboradores (2011)¹⁵³, que é baseada na preparação de uma solução de sementes (*seeds*) de Au seguido de uma etapa de crescimento das nanopartículas. A solução de sementes foi preparada aquecendo-se uma 150 mL de solução de citrato de sódio 2,2 mM em água Milli-Q em um balão de fundo redondo de três bocas de 250 mL por 15 min sob agitação vigorosa. Utilizou-se um condensador para evitar a evaporação do solvente. Deixou-se a solução em ebulição por 20 minutos para garantir que a temperatura esteja estável. Em seguida, adicionou-se 1 mL de HAuCl₄ (25 mM). Observou-se a mudança da coloração da solução de amarelo para cinza azulado, seguido da mudança para rosa suave em 10 minutos, obtendo-se a solução de sementes de Au.

Na etapa de crescimento, imediatamente após a síntese das sementes de Au, no mesmo balão reacional, a solução é resfriada até atingir 90 °C. Em

seguida, 1 mL de citrato de sódio (60 mM) e 1 mL de uma solução de HAuCl₄ (25 mM) adicionados em sequência. Observa-se imediatamente o escurecimento da solução para vermelho, obtendo-se as nanopartículas de ouro estabilizadas por citrato. Para retirar o excesso de citrato essas nanopartículas foram centrifugadas a 14000 rpm por 15 minutos e resuspendidas em água Milli-Q.

3.3.11.2. Síntese dos Nanobastões de Ouro (AuNR)

Os nanobastões de ouro foram sintetizados pelo método descrito por Tadepalli et al.(2017)⁶, que também é baseado na abordagem de crescimento mediada por sementes. A solução de semente foi preparada adicionando-se 0,6 mL de uma solução gelada de borohidreto de sódio (10 mM) em 10 mL de solução aquosa de Brometo de Cetiltrimetilamônio (CTAB, 0,1 M) e HAuCl₄(2,5 × 10⁻⁴M) sob agitação vigorosa a temperatura ambiente. Ocorre a mudança da coloração da solução da semente de amarelo para marrom.

Após preparar a solução de sementes, foi feita a solução de crescimento misturando-se 1 ml de HAuCl₄ (10 mM), 20 ml de CTAB (0,1M), 0,2 ml de nitrato de prata (10 mM), 0,16 ml de ácido ascórbico (0,1 M), 0,4 ml de HCl (1N), respectivamente. A solução foi homogeneizada por agitação suave obtendo-se uma solução incolor. Por fim, adicionou-se 48 µL de solução de semente preparada previamente e deixou-se no escuro por 14 h. A solução de AuNR resultante foi centrifugado a 14000 rpm por 15 minutos e resuspendida em água Milli-Q para retirar o excesso de estabilizante.

3.3.12. Estratégias de Incorporação das Nanoestruturas de Ouro

Considerando que a metodologia adotada de adição das nanopartículas de ouro pode ter impacto importante na atividade das enzimas imobilizadas, diversas estratégias foram estudadas para adição do ouro no bioconjugado avaliado. A atividade do bioconjugado diante das diferentes estratégias foram avaliadas para hidrólise do óleo de oliva.

3.3.12.1. *Estratégia A*

A incorporação do ouro nesta metodologia fez-se após a imobilização das enzimas lipase de *Pseudomonas fluorescens*. Inicialmente fez-se a imobilização da enzima utilizando os parâmetros otimizados da quimiometria, em seguida, o bioconjugado foi suspenso em tampão e as diferentes soluções de ouro foram adicionados na suspensão. Após a adição da solução de ouro, esperou-se até o desaparecimento da coloração característica das soluções de ouro.

3.3.12.2. *Estratégia B*

Nesta estratégia, as nanopartículas de ouro foram funcionalizadas com grupos NH₂, utilizando o cloridrato de cisteamina. Para isso, baseou-se na metodologia descrita por Liu e colaboradores¹⁵⁴, em que adiciona-se a solução de cisteamina (50 mM) à solução de AuNP ou AuNR na proporção 1:100 (v:v). A solução foi agitada por 4 h e o excesso de cisteamina foi removido com o auxílio de uma centrifuga. O produto final de cisteamina-Au foi redisperso em água e armazenado a 4 ° C.

As nanopartículas de ouro funcionalizadas foram adicionadas ao bioconjugado com a enzima lipase já imobilizada, seguido da adição da solução de glutaraldeído (5 µL). Deixou-se reagindo por 10 minutos, lavou-se o bioconjugado e, posteriormente, avaliado quanto a hidrólise do óleo de oliva.

3.3.12.3. *Estratégia C*

Previamente a imobilização da enzima, adicionou-se as nanopartículas de ouro funcionalizadas com cisteamina, seguido da adição do agente reticulante (5 μ L da solução de glutaraldeído), deixou-se reagir por 10 minutos, em seguida, fez-se a imobilização da enzima lipase de acordo com as condições otimizadas na quimiometria.

3.3.12.4. *Estratégia D*

Esta estratégia foi baseada na metodologia descrita por Tadepalli et al.¹³⁴, em que, previamente a imobilização, preparou-se a solução de enzima na concentração de imobilização, adicionou-se diferentes volumes da solução de ouro e deixou reagir por 24 horas a 4°C. Após a incorporação do ouro, a solução de enzima foi imobilizada de acordo com a metodologia otimizada.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nesta seção serão apresentados os estudos de síntese, caracterização e utilização como suporte das nanopartículas magnéticas sintetizadas pelo método solvotermal. Os resultados de síntese do estabilizante catiônico encontram-se no Apêndice A. Também serão apresentados estudos de imobilização para outras duas nanopartículas, disponibilizadas por colaboração com Bruno Bitarães Neto e Prof. Henrique Eisi Toma (USP-SP). Essas nanopartículas disponibilizadas foram primeiramente funcionalizadas com APTES e posteriormente com dimetilglioxima e HPO_3 , suas caracterizações estão apresentadas no Apêndice C.

4.1.1. Síntese e Caracterização das Nanopartículas Magnéticas

Na síntese solvotermal com etilenoglicol como solvente é utilizado apenas íons de Fe^{3+} , descartando a utilização de Fe^{2+} , necessário na síntese de coprecipitação. Isso ocorre devido o solvente atuar como agente redutor sendo responsável por reduzir os íons de ferro (III). Neste método de síntese, durante a homogeneização dos reagentes é formado um complexo hidratado entre o acetato e o cloreto de ferro(III)– IOAHH [$\text{Fe}_2\text{O}(\text{CH}_3\text{COO}^-)(\text{OH})_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$](Equação 2)^{155,156}, este precursor orgânico é posteriormente parcialmente reduzido a Fe^{2+} , atuando como um direcionador de estrutura¹⁵⁷. Através da utilização de um precursor orgânico obtém-se nanopartículas de magnetita com bom controle e estreita distribuição de tamanho, além da excelente cristalinidade observada por Roca e colaboradores¹⁵⁸. A representação esquemática das etapas e reações que ocorrem durante a síntese solvotermal encontra-se na FIGURA 4.1.

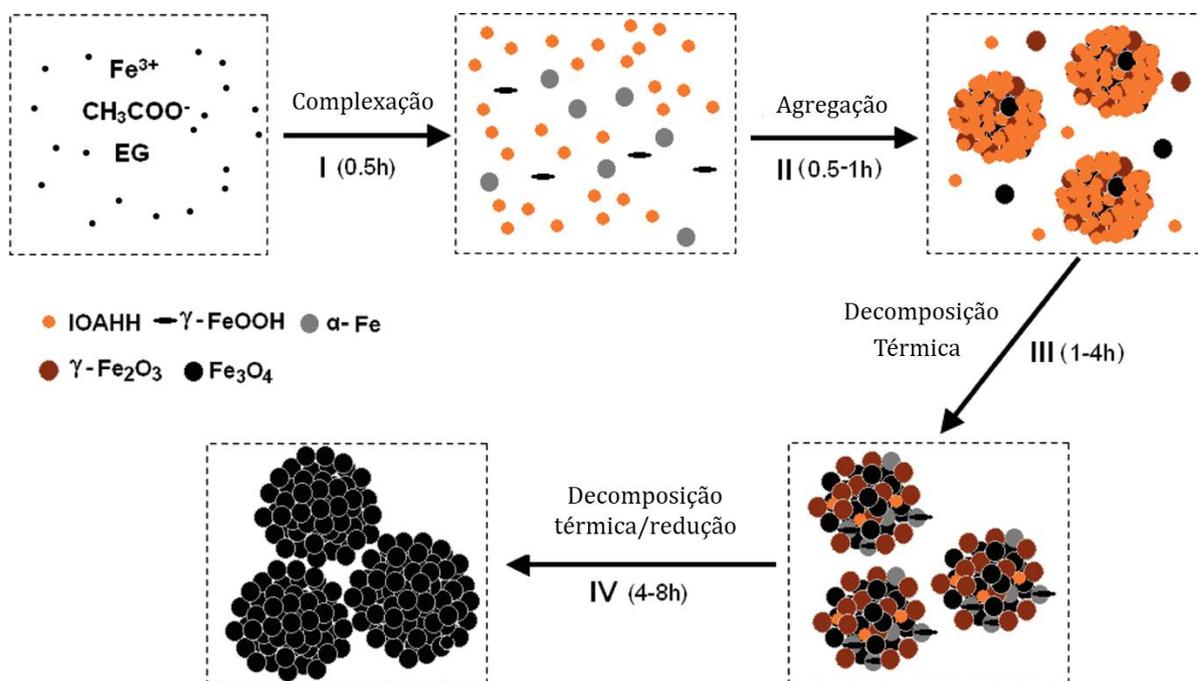
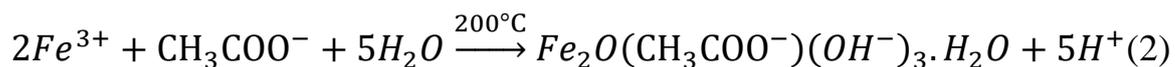


FIGURA 4. 1: Ilustração esquemática do mecanismo de formação das partículas de Fe_3O_4 . Fonte: Adaptado de Fan e colaboradores (2011)¹⁵⁶.

A nanopartícula sintetizada sem a presença de estabilizante foi avaliada quanto a fase de óxido de ferro por difratometria de raios X. No difratograma obtido, FIGURA 4.2, nota-se que os planos de difração podem ser associados a fase magnetita (JCPDS nº19-0629)^{159,160}. Observa-se também uma elevada cristalinidade das partículas obtidas e a ausência de picos correspondentes a outras fases, demonstrando a pureza do material obtido.

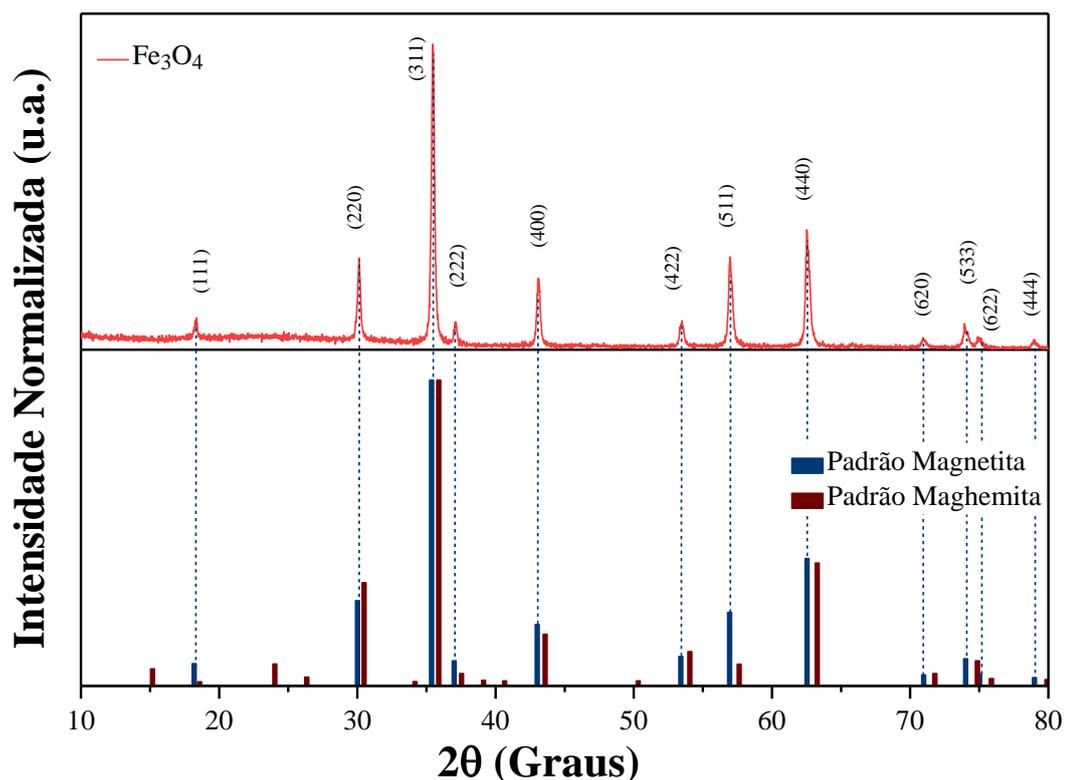


FIGURA 4. 2: Difractogramas de raios X para as nanopartículas sintetizadas sem a presença de estabilizante. Os padrões de difração da magnetita (JCPDS n° 19-0629) e da maghemita (JCPDS n° 39-1346) são mostrados na região inferior do gráfico para comparação.

Na FIGURA 4.2 estão apresentados os padrões de difração para a magnetita e maghemita e é possível notar a semelhança entre esses óxidos de ferro. Quando observado o padrão de difração da nanopartícula sintetizada sem a presença de estabilizantes observa-se um leve deslocamento dos picos, ficando em posições próximas ao padrão da maghemita, considerando que esse deslocamento pode estar associado a diferença estequiométrica na composição do material, instrumentação ou mudança nos parâmetros estruturais e não apenas a mudança de fase, calculou-se a distância interplanar (d) através da Lei de Bragg, representado na Equação 3, em que relaciona λ (comprimento de onda da radiação incidente), d (distância entre planos atômicos) e θ (ângulo de incidência em relação ao plano considerado). O parâmetro de rede (a) e o volume da célula

unitária, ambos calculados com o auxílio do software UnitCell para o pico de maior intensidade, correspondente ao plano (311).

$$2d_{hkl} \cdot \text{sen } \theta = n\lambda \quad (3)$$

Os valores calculados de parâmetro de rede, distancia interplanar e volume da célula unitária estão apresentados na TABELA 4.1. Pelos valores calculados, verifica-se que o material sintetizado corresponde a fase magnetita, já que se encontram mais próximos dos valores reportados para a magnetita.

TABELA 4. 1: Distância interplanar, parâmetro de célula e volume da célula unitária calculados para o material sintetizado e valores repostados na literatura para a magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$).

	<i>Distancia Interplanar (d)/Å</i>	<i>Parâmetro de rede (a)/Å</i>	<i>Volume da Célula Unitária/ Å³</i>
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	2,5116	8,3300	578,010
Fe_3O_4	2,5314	8,3958	591,815
<i>Material Sintetizado</i>	2,5320	8,39328	591,2831

Com a análise de DRX também foi possível estimar o tamanho médio dos cristalitos do material sintetizado utilizando a equação de Scherrer (Equação 4). Para os cálculos, considerou-se $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$ (radiação de Cu $K\alpha = 1,5418 \text{ \AA}$), $K = 0,94$ (considerando partículas esféricas), θ é o ângulo de difração do pico de maior intensidade (311) e B é a largura do pico a meia altura em radianos. O tamanho médio de cristalito foi estimado em 34 nm.

$$t_{\text{médio}} = \frac{K \cdot \lambda}{B \cdot \cos \theta} \quad (4)$$

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) foram coletadas das amostras sintetizadas sem a presença de estabilizantes para investigar a morfologia e o tamanho das partículas (FIGURA 4.3). Pelas imagens observa-se que as nanopartículas foram sintetizadas com morfologia esférica com tamanho médio de aproximadamente 30 nm, corroborando com o resultado de DRX. Isso porque quando o tamanho da partícula é menor que 100 nm pode-se considerar o tamanho de cristalito como o tamanho médio de partícula^{161,162}.

Nas imagens da FIGURA 4.3 nota-se uma grande aglomeração das nanopartículas, ocorrendo a formação de *clusters* de tamanho maiores, de aproximadamente 200 nm. Considerando que o monodomínio da magnetita ocorre em tamanhos de partícula abaixo de 30 nm, foi estudada a síntese na presença de diferentes estabilizantes para impedir e/ou diminuir a aglomeração das mesmas. Os estabilizantes avaliados foram o citrato de sódio ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$), o estabilizante imidazólico catiônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) e o estabilizante imidazólico zwitteriônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}$).

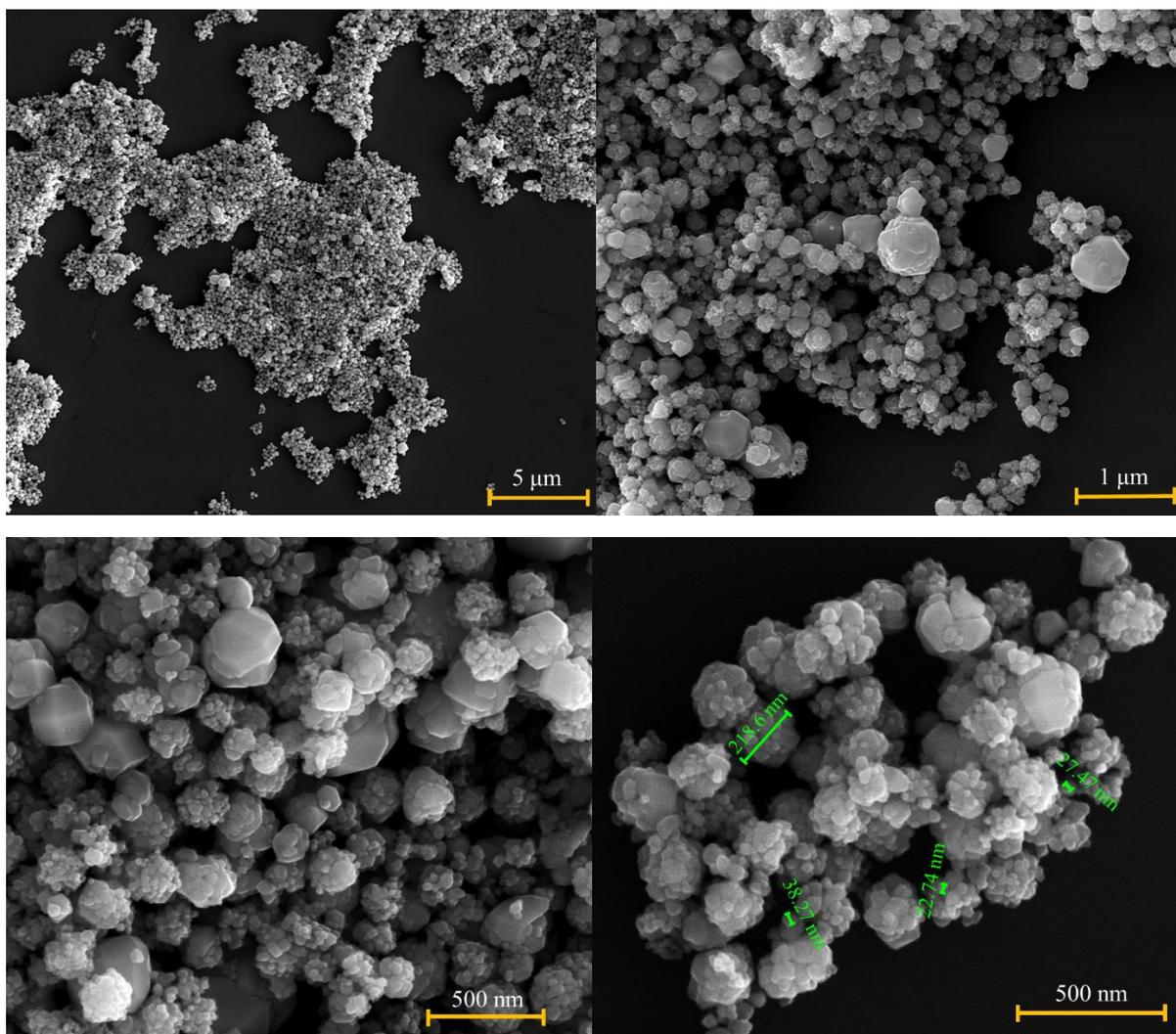


FIGURA 4. 3: Imagens de microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (MEV-FEG) para as nanopartículas sintetizadas sem a presença de estabilizantes.

Nos difratogramas obtidos para as amostras de nanopartículas magnéticas sintetizadas na presença dos diferentes estabilizantes, FIGURA 4.4, observa-se que não houve modificação na fase de óxido de ferro formado, indicando a presença da fase magnetita (JCPDS nº19-0629). Além disso, pode-se verificar o alargamento dos picos de difração, indicando a redução do tamanho das partículas sintetizadas¹⁶². Nota-se também que os picos de difração obtidos são bem definidos, demonstrando que os estabilizantes iônicos não influenciaram significativamente na cristalinidade das nanopartículas, apenas no tamanho das mesmas.

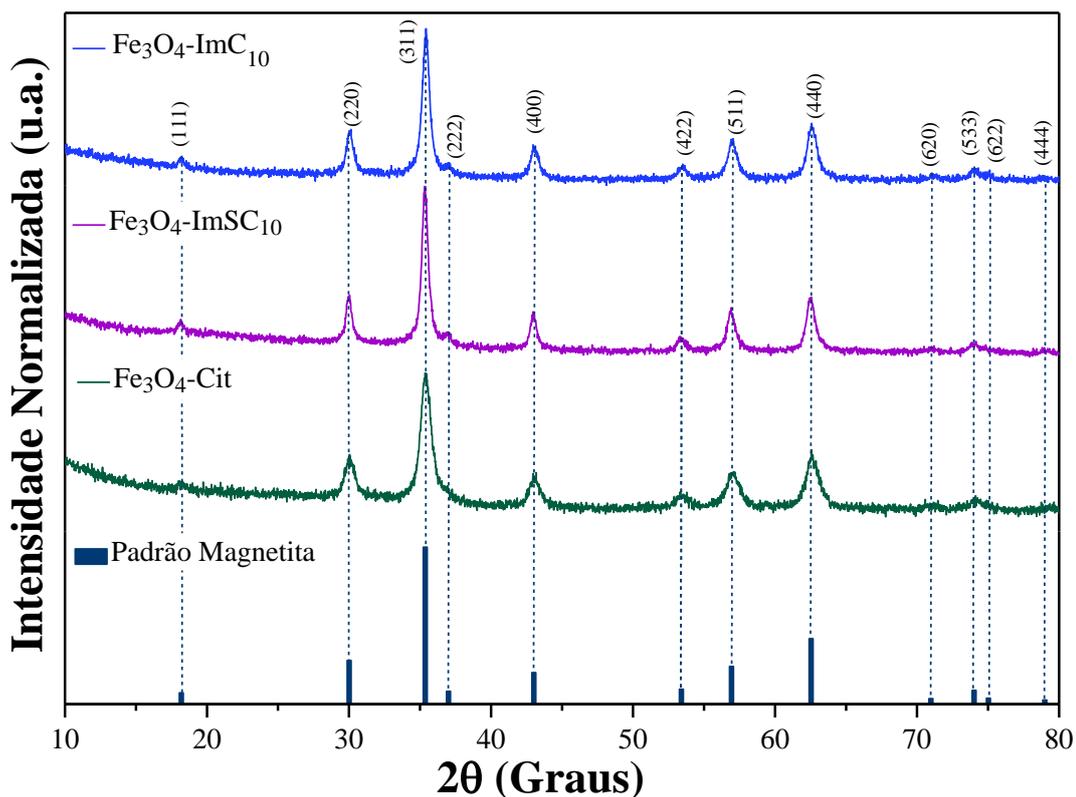


FIGURA 4. 4: Difratoograma de raios X do Fe₃O₄ obtido pelo método solvotermal na a presença de estabilizantes de diferentes estabilizantes.

A diminuição do tamanho das nanopartículas pela utilização dos estabilizantes imidazólicos pode ser atribuída à capacidade deformarem micelas reversas durante a síntese solvotermal, que atuam como nanorreatores para a formação das nanopartículas¹⁶³. No caso do citrato, a redução do tamanho é devido à sua capacidade de coordenar nos átomos de ferro superficiais¹³⁹. Estes estabilizantes atuam funcionalizando a superfície das nanopartículas provocando impedimento estérico na etapa de aglomeração (FIGURA 4.5), controlando o tamanho das mesmas.

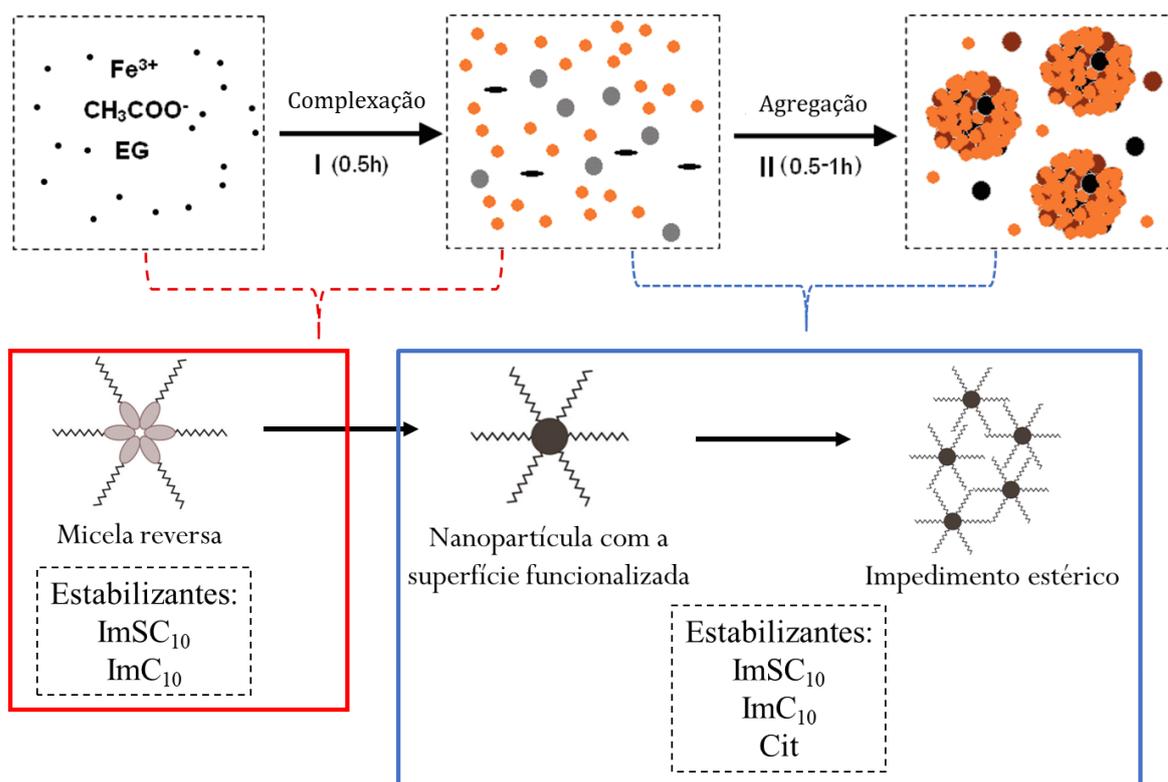


FIGURA 4. 5: Ilustração esquemática das etapas de atuação dos estabilizantes na síntese solvotermal. Fonte: Adaptado de Fan et al. (2011)¹⁵⁶.

Não foi possível obter as imagens das nanopartículas sintetizadas na presença dos estabilizantes por MEV-FEG, devido a diminuição do tamanho das nanopartículas e a limitação do equipamento. Deste modo, considerando que o tamanho observado nas imagens de microscopia para as nanopartículas sintetizadas sem estabilizantes e o tamanho das nanopartículas estimada por DRX foram semelhantes, calculou-se o tamanho médio das partículas para os padrões de DRX do material sintetizado na presença dos diferentes estabilizantes. Na TABELA 4.2 estão apresentados os valores calculados para o tamanho de cristalito das diferentes nanopartículas sintetizadas e os parâmetros utilizados no cálculo, como posição do pico de difração e largura à meia altura deste pico (FWHM – *Full-Width at Half-Maximum*). Observa-se que ocorreu a diminuição do tamanho dos cristalitos quando as nanopartículas foram sintetizadas na presença dos estabilizantes e que o citrato apresentou menor tamanho de cristalito

(10 nm). Os parâmetros de rede calculados para as nanopartículas sintetizadas na presença de estabilizantes encontra-se em apêndice (TABELA B.1).

TABELA 4. 2: Tamanho de partícula para as diferentes nanopartículas sintetizadas, posição de pico de maior intensidade correspondente e largura à meia altura (FWHM) do plano (311) conforme encontrado na análise de DRX.

<i>Nanopartícula</i>	<i>2θ (Graus)</i>	<i>FWHM (Graus)</i>	<i>Tamanho médio de Cristalito (nm)</i>
<i>Fe₃O₄</i>	35,47	0,25641	34
<i>Fe₃O₄-Cit</i>	35,41	0,85604	10
<i>Fe₃O₄-ImC₁₀</i>	35,35	0,52213	16
<i>Fe₃O₄-ImSC₁₀</i>	35,42	0,77019	12

A diminuição do tamanho de cristalito associado com a diminuição do tamanho da nanopartícula foi observado também por Ardelean e colaboradores¹⁶⁴, em que a utilização de agentes estabilizantes aumentou a área superficial em consequência da diminuição do tamanho das nanopartículas, segundo análises realizadas por BET. Ficai et al.¹⁶⁵ também observou que a utilização de estabilizante, mais especificamente o citrato, ocasionou na diminuição significativa do tamanho de poro das nanopartículas acompanhado da diminuição do tamanho das mesmas. Tais características são fatores importantes para a utilização dessas nanopartículas como suporte na imobilização enzimática, uma vez que o aumento da área superficial favorece maior funcionalização e consequente maior carga de enzima imobilizada⁴⁷. Ademais, a presença de poros muito grandes envolvem uma área superficial relativamente baixa, impedindo altas cargas enzimáticas^{47,166}.

Posteriormente às análises de DRX, foram coletados espectros de FTIR (FIGURA 4.6) de todas as nanopartículas sintetizadas. Nos espectros

observa-se o estiramento da ligação Fe–O ocupando os sítios tetraédricos, em 585 cm^{-1} e octaédricos em 385 cm^{-1} , característicos da estrutura do tipo espinel invertida da magnetita^{92,167}, corroborando com a fase identificada pelo padrão de raios X. O estiramento do Fe–O tetraédrico pode ocorrer entre $540\text{--}585\text{ nm}$ ¹⁶⁸, esse deslocamento para maiores números de onda observado para as nanopartículas sintetizadas neste trabalho indica que mais íons de Fe^{3+} entraram nos locais tetraédricos ao longo do tempo de reação e a estrutura espinel invertida se torna mais perfeita, obtendo melhor resposta magnética¹⁵⁷.

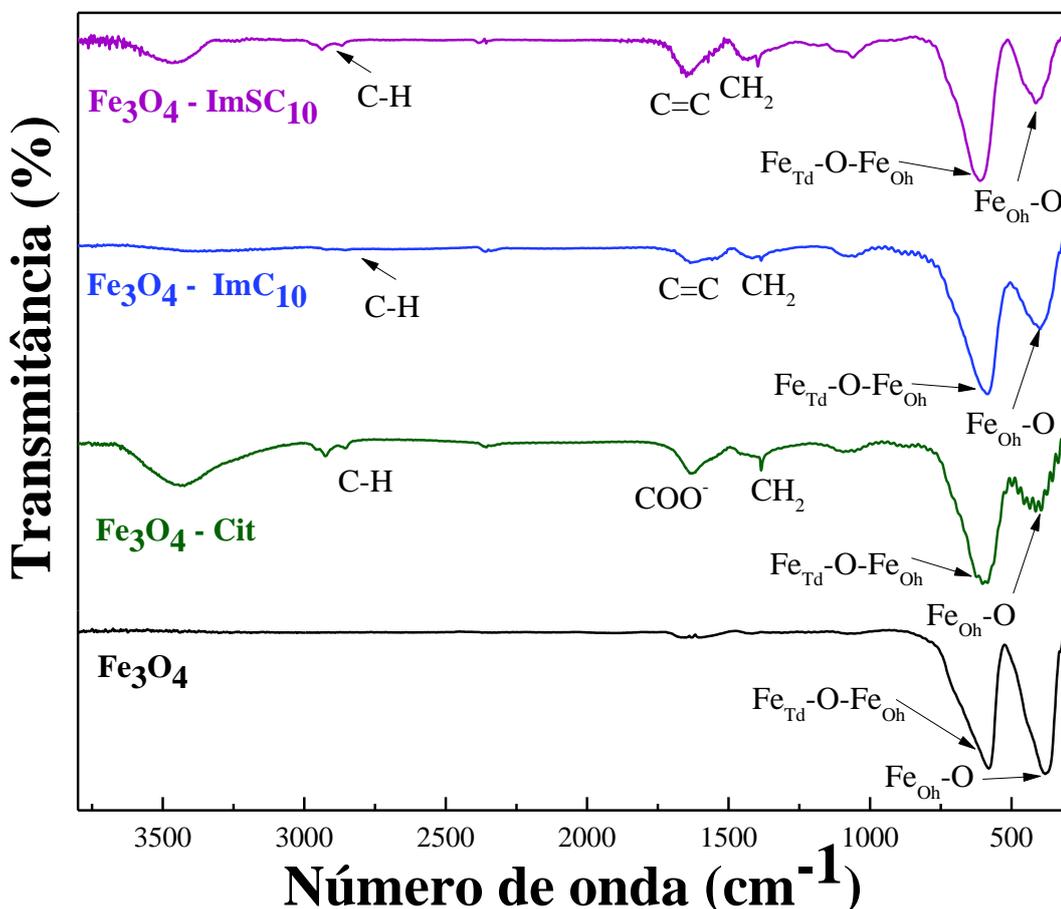


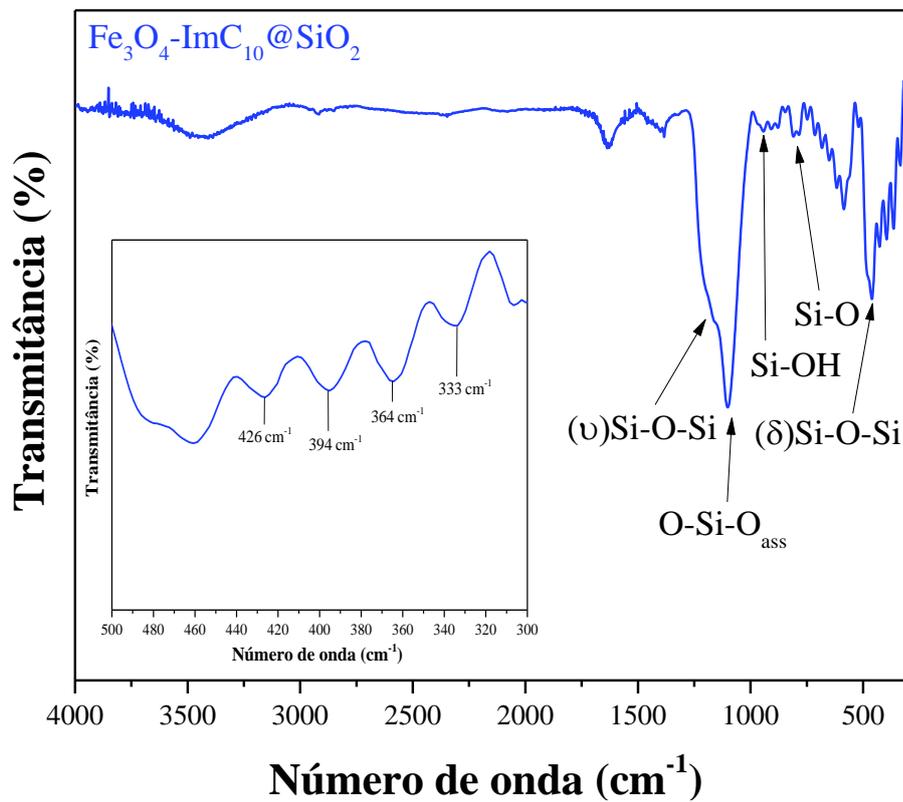
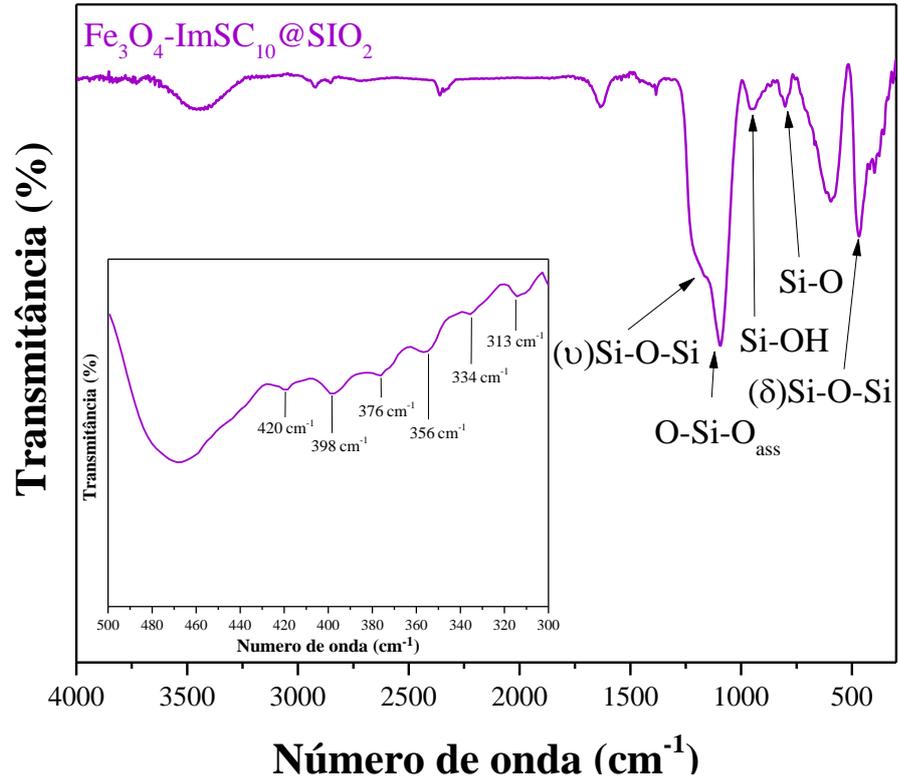
FIGURA 4. 6: Espectro de FTIR para as nanopartículas de Fe_3O_4 sintetizadas sem a presença de estabilizantes e na presença de diferentes estabilizantes.

Na FIGURA 4.6 observa-se as vibrações dos grupos funcionais orgânicos dos estabilizantes na faixa de $4000\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$. Em aproximadamente

3400 cm^{-1} observa-se uma banda alargada com baixa intensidade referente às hidroxilas superficiais do material a baixa intensidade do estiramento O–H. A presença do estabilizante catiônico (ImC₁₀) e zwitteriônico (ImSC₁₀) na superfície do material pode ser comprovada pelo estiramento da ligação C=C do imidazol^{169,170} em aproximadamente 1580 cm^{-1} . Para as nanopartículas sintetizadas na presença do citrato observa-se bandas correspondentes ao estiramento C–H¹⁶⁵ que entre 2800-3000 cm^{-1} e bandas em 1628 e 1400 cm^{-1} associadas ao grupo carboxilato¹⁵⁷, indicando a presença do citrato de sódio atuando na superfície do material.

4.1.2. Recobrimento das Nanopartículas

Posteriormente à síntese e caracterização das nanopartículas foi estudado a metodologia mais adequada de recobrimento das mesmas com SiO₂, uma vez que são suscetíveis à oxidação pelo ar atmosférico e no meio reacional, perdendo seu caráter magnético. Inicialmente, o recobrimento das nanopartículas foi feito pelo método de Stöber. Após o recobrimento foram registrados os espectros de infravermelho para todas as nanopartículas recobertas (Fe₃O₄-ImSC₁₀, Fe₃O₄-ImC₁₀ e Fe₃O₄-Cit). Pelos espectros de infravermelho (Figura 4.7), observa-se bandas em aproximadamente 1250 cm^{-1} e 1080 cm^{-1} referentes a vibração assimétrica das ligações Si-O-Si e O-Si-O^{171,172}. As bandas em 960 cm^{-1} , 800 cm^{-1} e 470 cm^{-1} podem ser atribuídas ao grupo silanol (Si-OH) presente na superfície das nanopartículas, a deformação angular das ligações Si-O e ao estiramento simétrico O-Si-O, respectivamente^{172,173}.



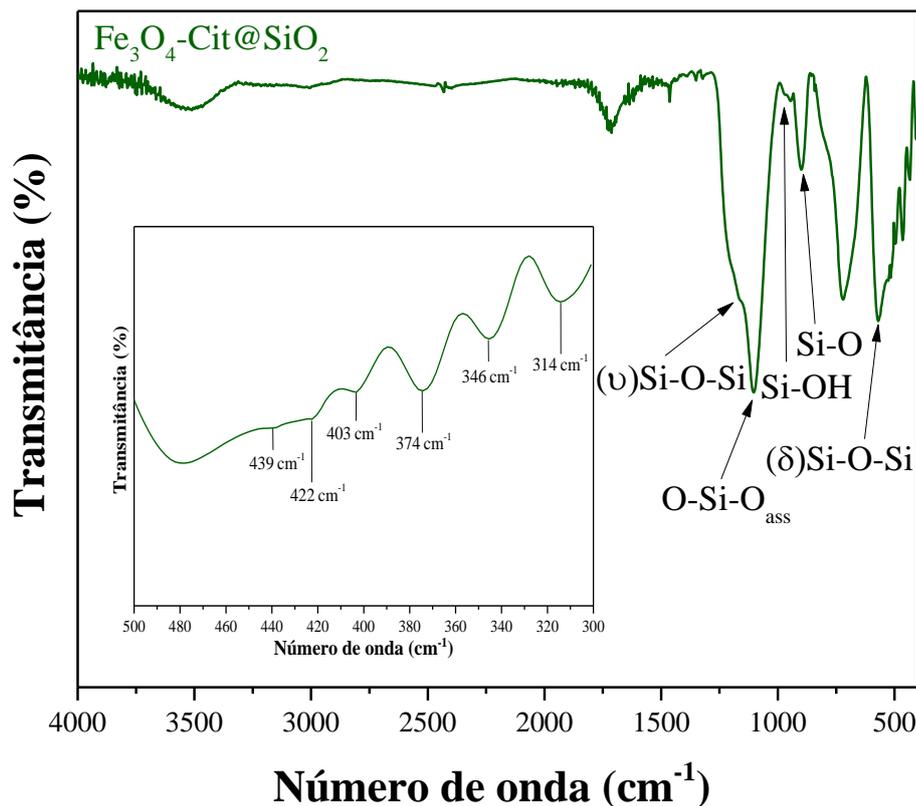
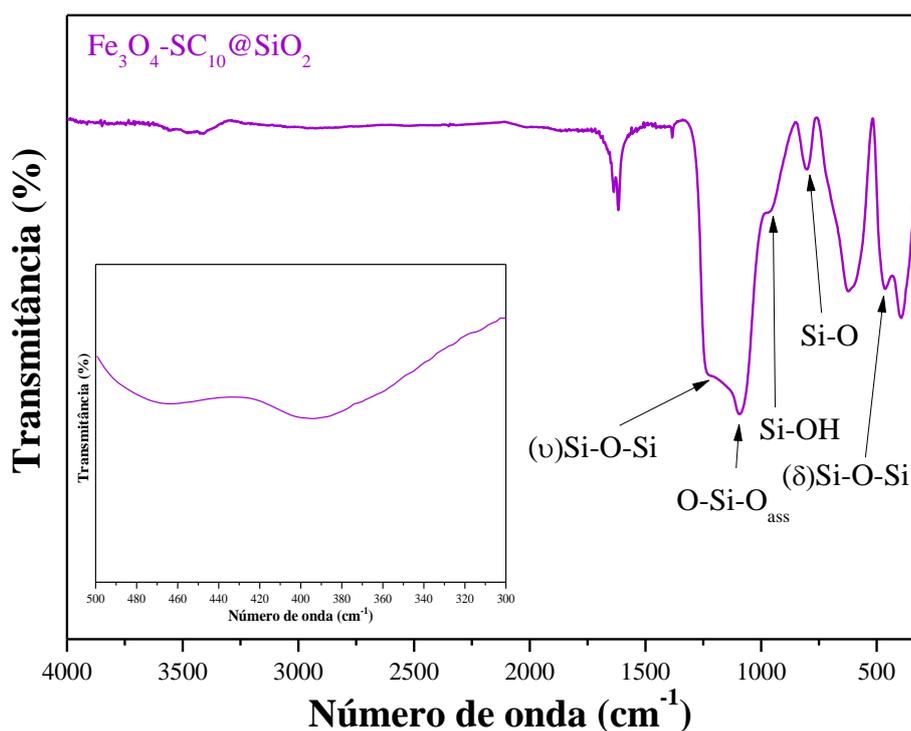


FIGURA 4. 7: Espectros de FTIR para as diferentes nanopartículas de Fe_3O_4 recobertas pelo método de Stöber na região de 4000 a 300 cm^{-1} e região de 500 a 300 cm^{-1} inserido nos gráficos.

A região do espectro de FTIR de 500 a 300 cm^{-1} (gráficos inseridos nos espectros da FIGURA 4.7) foi utilizado para diferenciar a magnetita da maghemita¹⁷⁴. Nessa região observa-se o aparecimento de diversas bandas que não estavam presentes previamente ao recobrimento como pode-se observar na FIGURA 4.6. A presença dessas bandas indica uma estrutura com vacâncias^{92,174} devido a oxidação do Fe^{2+} nos sítios octaédricos da magnetita, sugerindo que as nanopartículas sofreram oxidação durante o processo de recobrimento. Zou e colaboradores¹⁴⁴, verificaram através de análises de espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS) que utilizando elevado valor de pH (≈ 11) no processo de recobrimento resulta na oxidação das nanopartículas de Fe_3O_4 a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$.

Por possuir uma melhor resposta magnética, é interessante realizar o recobrimento das nanopartículas de magnetita evitando sua oxidação. Desta forma optou-se por avaliar o método bifase para o recobrimento em que se utiliza condição de pH que não resulte na oxidação das nanopartículas e descarta a utilização de solventes orgânicos. Em contraste com o método de Stöber, o espectro na região do infravermelho para as nanopartículas sintetizadas pelo método bifase (FIGURA 4.8) não apresentou bandas na faixa de 500-300 cm^{-1} , indicando que as mesmas não sofreram oxidação, uma vez que no método adotado é utilizado a hidrazina como catalisador, que pode recobrir a partícula e evitar a oxidação do Fe_3O_4 sem a necessidade de utilizar atmosfera inerte. Este recobrimento pode ser visto nos espectros na região do infravermelho,



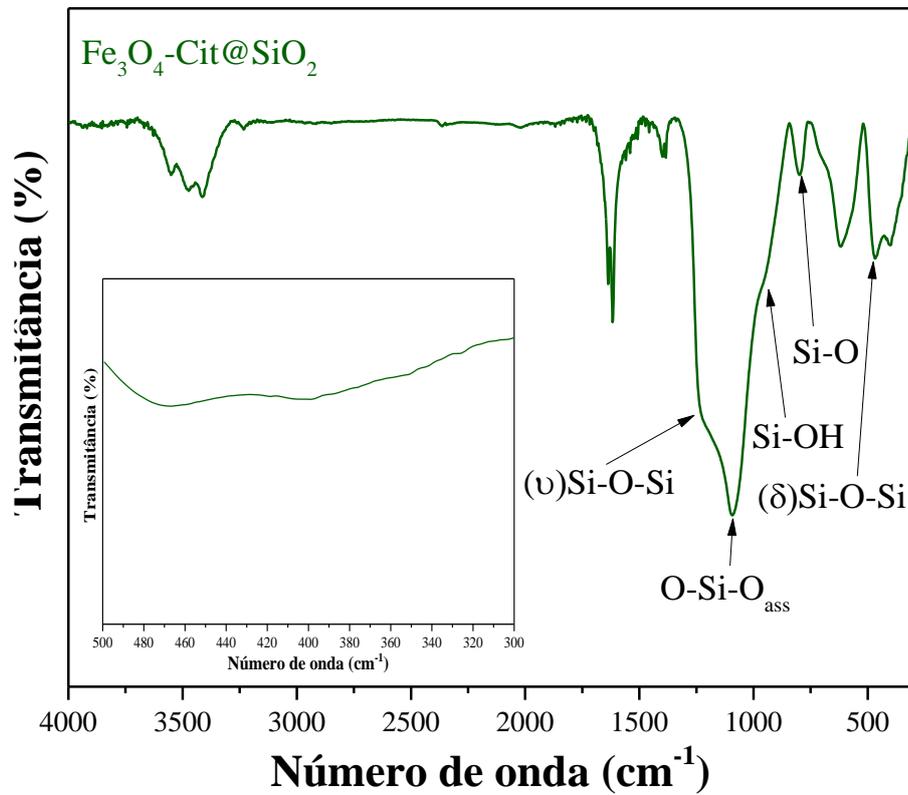
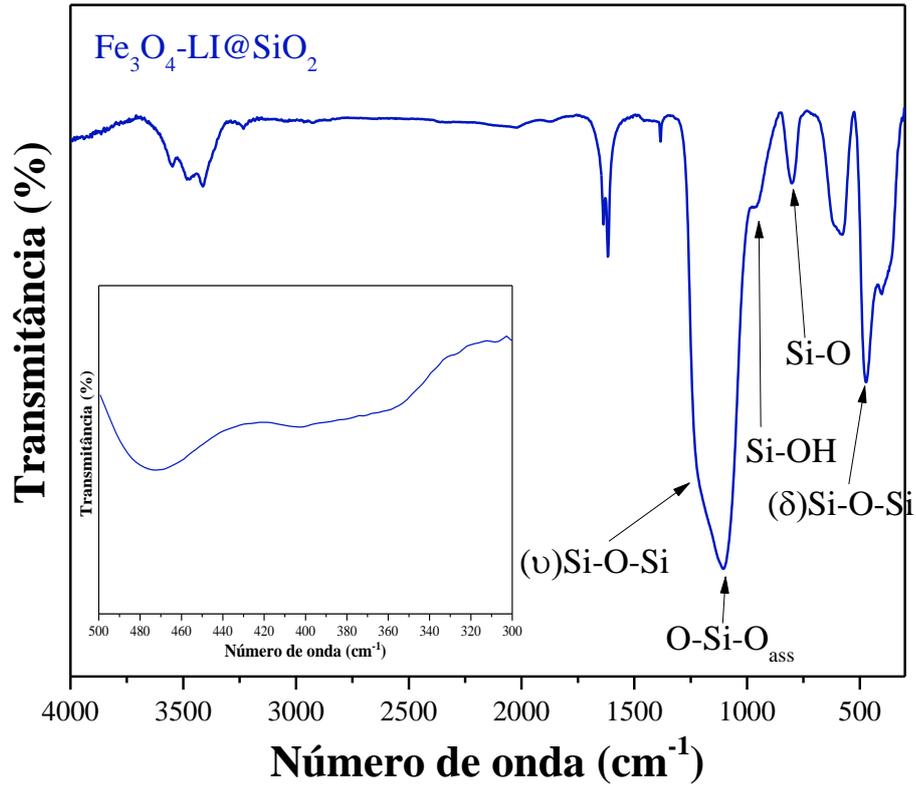


FIGURA 4. 8: Espectros de FTIR para as diferentes nanopartículas de Fe₃O₄ recobertas pelo método Bifase na região de 4000 a 300 cm⁻¹ e região de 500 a 300 cm⁻¹ inserido nos gráficos.

Os espectros apresentados na Figura 4.8 exibem bandas características de água ($3549 - 3409 \text{ cm}^{-1}$) devido a vibrações de estiramento assimétrico e simétrico de OH, em 1637 cm^{-1} observa-se o dobramento HOH. Além destas bandas, observa-se também uma banda intensa em 1615 cm^{-1} que pode ser correspondente ao dobramento assimétrico da hidrazina, indicando a possível presença de hidrazina na superfície das partículas mesmo após as lavagens. Destes espectros é possível observar também que as partículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SC}_{10}\text{@SiO}_2$ apresentam um menor conteúdo de água.

Confirma-se a presença de SiO_2 recobrindo as nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 ao se observar a região de $1250\text{-}900 \text{ cm}^{-1}$. Considerando as vantagens do método bifase, a eficiência no recobrimento das nanopartículas e a elevada estabilidade química do recobrimento formado¹⁴⁴, assumiu-se essa metodologia para prosseguir com a funcionalização.

4.1.3. Funcionalização das Nanopartículas

Após o recobrimento com SiO_2 , fez-se a funcionalização das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@SiO}_2$ utilizando o 3-aminopropiltrimetilsilano. Com o fim do processo de modificação superficial, utilizou-se o método colorimétrico de determinação da densidade de amina para confirmar e quantificar a funcionalização, visto que não foi possível verificar a funcionalização por infravermelho.

Como pode-se observar na FIGURA 4.9-a, a nanopartícula que apresentou maior densidade de grupos NH_2 foi a sintetizada em presença do estabilizante catiônico ($17,4 \text{ nmol mg}^{-1}$), seguido das nanopartículas sintetizadas utilizando o estabilizante zwitteriônico ($8,5 \text{ nmol mg}^{-1}$) e o citrato ($3,3 \text{ nmol mg}^{-1}$). Esse fato pode estar relacionado a formação de nanopartículas recobertas “multi-core”, no qual ocorre um aumento do tamanho das nanopartículas, devido

a presença de vários núcleos magnéticos, e a diminuição da área superficial, acarretando na diminuição da densidade de NH_2 superficial, como esquematizado na FIGURA 4.9-b. A curva analítica do 4-benzaldeído utilizada para a quantificação indireta dos grupos amina está apresentada na FIGURA B.1 juntamente com a equação da reta, no Apêndice B.

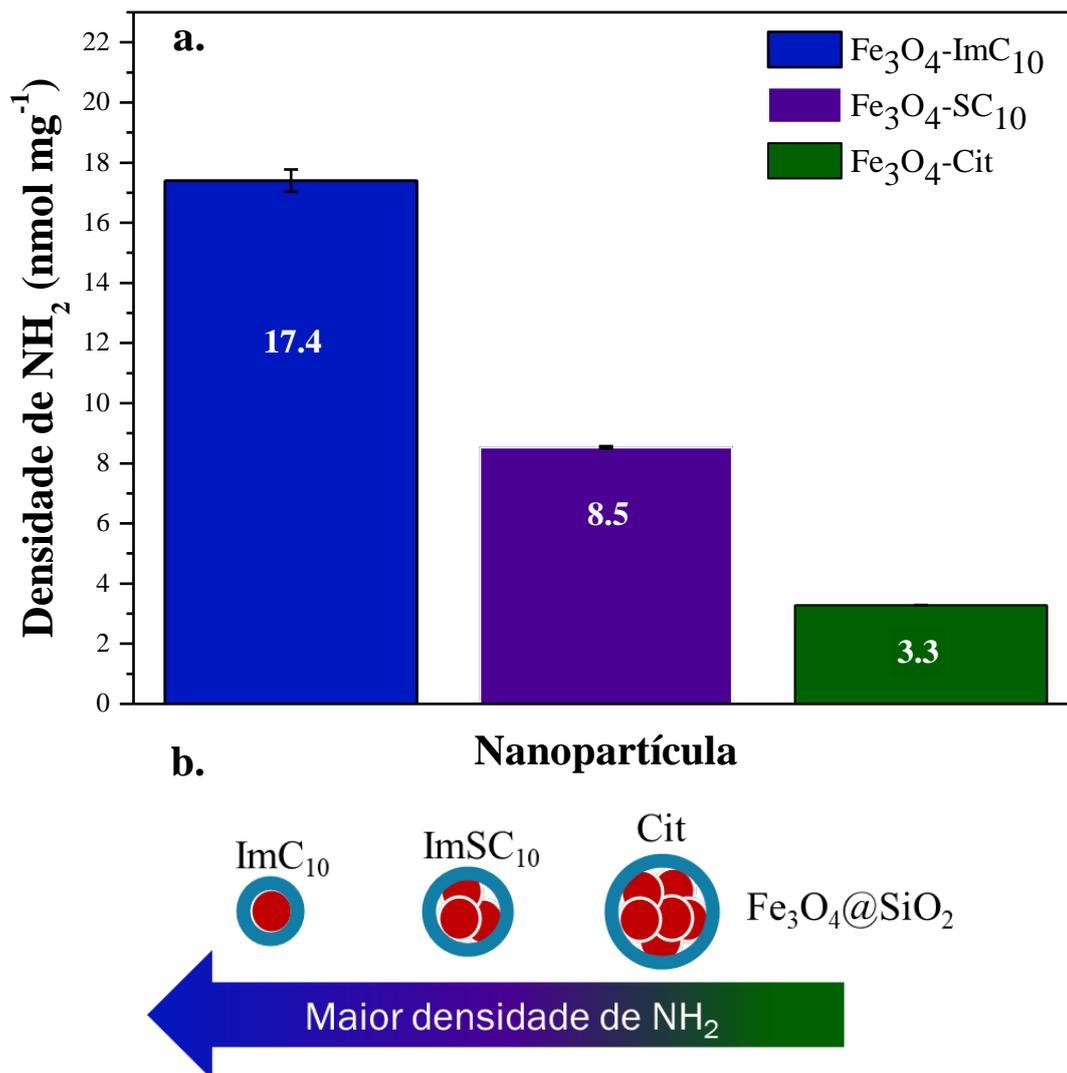


FIGURA 4. 9: Densidade de grupos amino para as diferentes nanopartículas funcionalizadas (a) e representação esquemática da relação entre o tamanho das nanopartículas recobertas e a densidade de grupos amino superficiais (b).

A funcionalização pode estar então associada ao tipo de estabilizante utilizado, uma vez que pode haver a formação de nanoclusters durante o

recobrimento e a diminuição da área superficial das nanopartículas. Li et al.¹⁵⁷ observaram que os grupos funcionais das moléculas de citrato tem a capacidade de aderir à superfície das nanopartículas magnéticas e atuarem como agente estabilizante e como ponte entre duas ou mais nanopartículas. Esse efeito faz com que a molécula de citrato impeça o crescimento dos cristalitos, porém pode haver a formação de nanoclusters como demonstrado no esquema apresentado na FIGURA 4.10-a. Um efeito semelhante, mas em menor proporção, pode estar ocorrendo quando se utiliza o estabilizante zwitteriônico, uma vez que sua molécula pode interagir com a superfície da nanopartícula através de duas unidades, como demonstrado na FIGURA 4.10-b. Ademais, segundo Blackman e colaboradores¹⁷⁵, se primeiramente ocorrer a adsorção da unidade com carga positiva do estabilizante na superfície negativa da nanopartícula, por efeitos de repulsão, a unidade negativa da molécula zwitteriônica é direcionada para a solução, podendo ocorrer então a interação da unidade negativa com o átomo de ferro superficial de outra nanopartícula, que é considerado deficiente em elétrons¹⁷⁶.

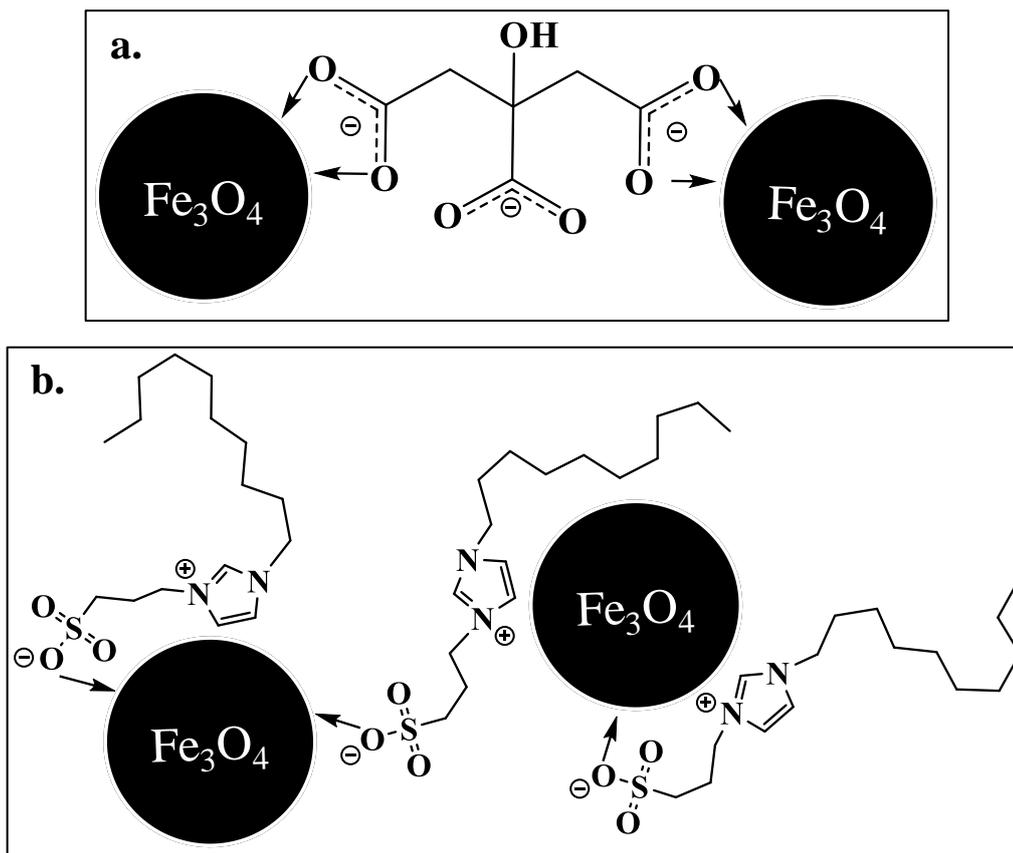


FIGURA 4. 10: Ilustração esquemática do efeito do estabilizante nas nanopartículas de magnetita: proposta da estabilização utilizando o citrato (a) e o estabilizante zwitteriônico (b).

Foram realizadas análises das porcentagens de carbono, hidrogênio e nitrogênio para as nanopartículas funcionalizadas, observando-se os resultados da TABELA 4.3. Pela análise dos dados de CHNS nota-se a presença de enxofre (S) na nanopartícula sintetizada na presença do estabilizante zwitteriônico, devido ao grupo sulfonato do estabilizante, demonstrando que o estabilizante permanece mesmo após o recobrimento e funcionalização das nanopartículas. Com a análise elementar é possível estimar uma fórmula mínima, encontrando-se para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}\text{@SiO}_2\text{-NH}_2$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit@SiO}_2\text{-NH}_2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}\text{@SiO}_2\text{-NH}_2$ as fórmulas: $\text{Fe}_3\text{O}_4(1.5\text{H}_2\text{O})(0.95\text{SiO}_2)(0.05\text{N}_2\text{H}_4)(0.05\text{ImC}_{10})(0.05\text{APTS})$, $\text{Fe}_3\text{O}_4(3.9\text{H}_2\text{O})(4\text{SiO}_2)(0.1\text{N}_2\text{H}_4)(0.3\text{Citrato})(0.2\text{APTS})$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4(2.7\text{H}_2\text{O})(3.8\text{SiO}_2)(0.07\text{N}_2\text{H}_4)(0.07\text{ImSC}_{10})(0.07\text{APTS})$, respectivamente. Considerando-se um valor de 8.397\AA para a aresta de uma célula unitária de

Fe_3O_4 , obtém-se um volume de 592,07 Å³. Para estimar quanto de APTS cada partícula possui é possível calcular o volume de uma esfera ($V=4\pi(r)^3/3$) para cada partícula e dividir pelo volume de uma célula unitária. Este valor multiplicado pelo número de Fe_3O_4 contidos na célula unitária indicam quantos Fe_3O_4 cada partícula possui. Com isto, uma simples regra de três nos dará que a partícula sintetizada com citrato possui aproximadamente 1400 moléculas de APTS na sua superfície, que a partícula sintetizada na presença do surfactante catiônico possui 1450 moléculas de APTS e que a sintetizada com o surfactante zwitteriônico possui em torno de 850 moléculas de APTS em sua superfície. Estes valores vão em contraste com os valores de amina livre disponível. Considerando-se a presença de azida na superfície a partícula Fe_3O_4 -ImC₁₀@SiO₂-NH₂ apresenta maior quantidade de amina disponível na superfície, entretanto, os valores para Fe_3O_4 -Cit@SiO₂-NH₂ e Fe_3O_4 -ImSC₁₀@SiO₂-NH₂ encontram-se alternados. Desta forma, é necessário avaliar como as técnicas são feitas, pois a análise elementar reúne valores de aminas não-disponíveis e disponíveis, enquanto a reação com 4-nitrobenzaldeído apenas ocorre com aminas disponíveis na superfície, indicando mais uma vez que as partículas de citrato devem ter aglomerado durante o processo de recobrimento e silanização, como mostrado na figura 4.9.

TABELA 4. 3: Análise elementar para as diferentes nanopartículas funcionalizadas com APTES.

	%C	%H	%N	%S
<i>Fe₃O₄-Cit@SiO₂-NH₂</i>	2,99	1,82	0,92	0
<i>Fe₃O₄-ImC₁₀@SiO₂-NH₂</i>	2,92	1,44	0,91	0
<i>Fe₃O₄-ImSC₁₀@SiO₂-NH₂</i>	3.12	1.59	1.01	3.80

4.1.4. Estudo da Reação de Obtenção de Ésteres Metílico de Ácido Graxo

Visto que as lipases podem catalisar diversas reações, como as reações de resolução racêmica e as reações inversas (esterificação, transesterificação e interesterificação), e considerando que a obtenção de ésteres alquílicos de ácidos graxos pode ser feita através das reações de transesterificação ou hidroesterificação do óleo vegetal (FIGURA 4.11), investigou-se o tipo de reação mais adequado para obtenção dos ésteres pelas enzimas lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizadas no suporte magnético. Para isto, foi avaliada a capacidade dessa enzima em converter o óleo de soja utilizando metanol como acil receptor para ambas as reações. A reação de hidroesterificação foi avaliada adicionando diferentes quantidades de água ao meio reacional.

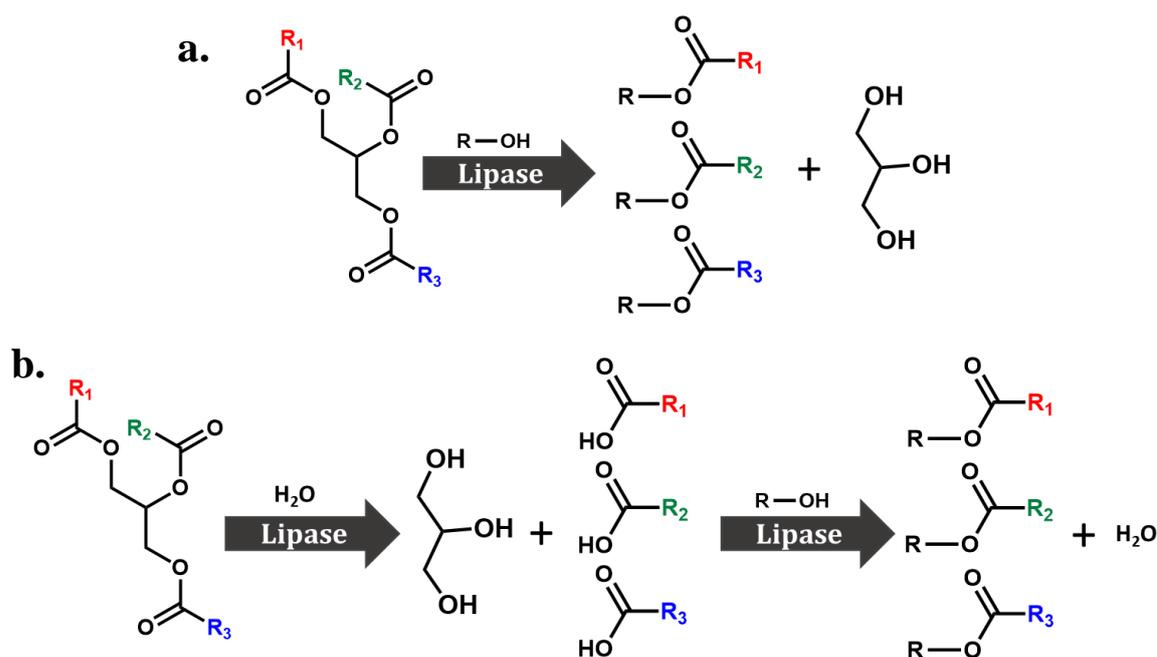


FIGURA 4. 11: Reações de obtenção de ésteres alquílicos de ácido graxo que podem ser catalisadas por enzimas lipase: Transesterificação (a) e Hidroesterificação (b).

O monitoramento das reações de obtenção dos ésteres alquílicos de ácido graxo foi feito utilizando a técnica de ressonância magnética nuclear de ^1H , acompanhando os sinais referentes aos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME – *Fatty Acid Methyl Ester*). A conversão do óleo de soja foi calculada pela Equação 5¹⁷⁷, na qual aplica-se os valores de integração do singlete dos prótons do éster metílico (I_{ME}), que ocorre em $\approx 3,7$ ppm, e do multiplete dos hidrogênios do grupo α -carbonilmetileno ($I_{\alpha-CH_2}$), que ocorre em aproximadamente 2,3 ppm e está presente em todos os óleos vegetais.

$$C_{ME} = 100 \cdot \frac{2I_{ME}}{3I_{\alpha-CH_2}} \quad (5)$$

Os valores de resultados de conversão calculados para as reações de transesterificação e hidroesterificação estão apresentados no gráfico da FIGURA 4.12. Através dos resultados da FIGURA 4.12, pode-se observar que a reação de transesterificação apresentou baixos níveis de conversão, quando comparado a reação de hidroesterificação, na qual ocorre a hidrólise do triacilglicerídeo seguida da esterificação dos monoglicerídeos. A melhora na resposta de conversão obtida pela reação de hidroesterificação pode estar associada não apenas pela necessidade água de hidratação para manter a estrutura tridimensional da enzima, mas também pela melhor ativação interfacial das enzimas lipase¹⁷⁸ que expõe o sítio ativo da enzima ao substrato.

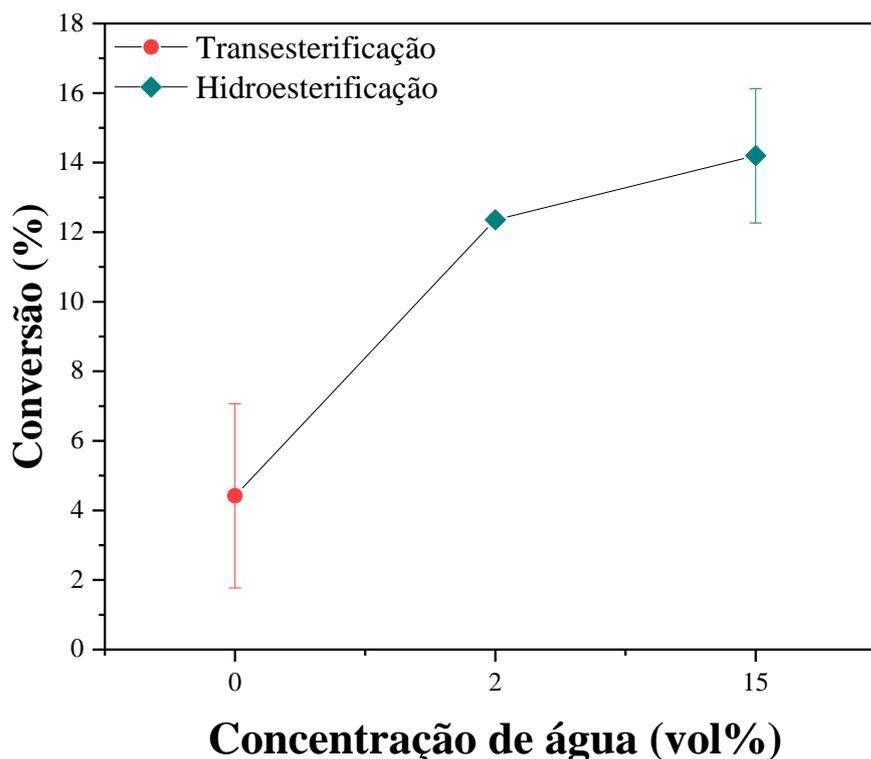


FIGURA 4. 12: Efeito do teor de água na conversão do óleo de soja a FAME catalisada pela enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens*.

Nota-se também que o aumento no teor de água de 2 a 15% não influenciou significativamente nos valores de conversão, assim, optou-se por utilizar o menor valor de água (2%). Uma vez que as enzimas requerem um certo nível de água em suas estruturas para manter sua conformação natural, permitindo que elas ofereçam sua funcionalidade completa¹⁷⁹, investigou-se se a quantidade de água adicionada estava possibilitando que ocorresse a reação de hidroesterificação ou se a água adicionada estava atuando apenas como água de hidratação da enzima. Para isso analisou-se os espectros de ¹H RMN para a mistura reacional sem a presença de água e com a adição de 2% de água. Observou-se na FIGURA 4.13 o aparecimento de picos correspondentes aos produtos de hidrólise do triacilglicerídeo que não estão presentes quando não há adição de água. Segundo o estudo feito por Nieva et al.¹⁸⁰ os deslocamentos químicos observados para os produtos de hidrólise correspondem ao 1,2-diglicerídeo (1,2-DG) e ao 2-monoglicerídeo (2-MG). Pelos dados experimentais,

comprova-se que a água adicionada, mesmo em baixa quantidade, está atuando na reação de hidrólise do substrato, indicando que ocorre preferencialmente a hidroesterificação, já que há uma melhora significativa nos valores de conversão observados.

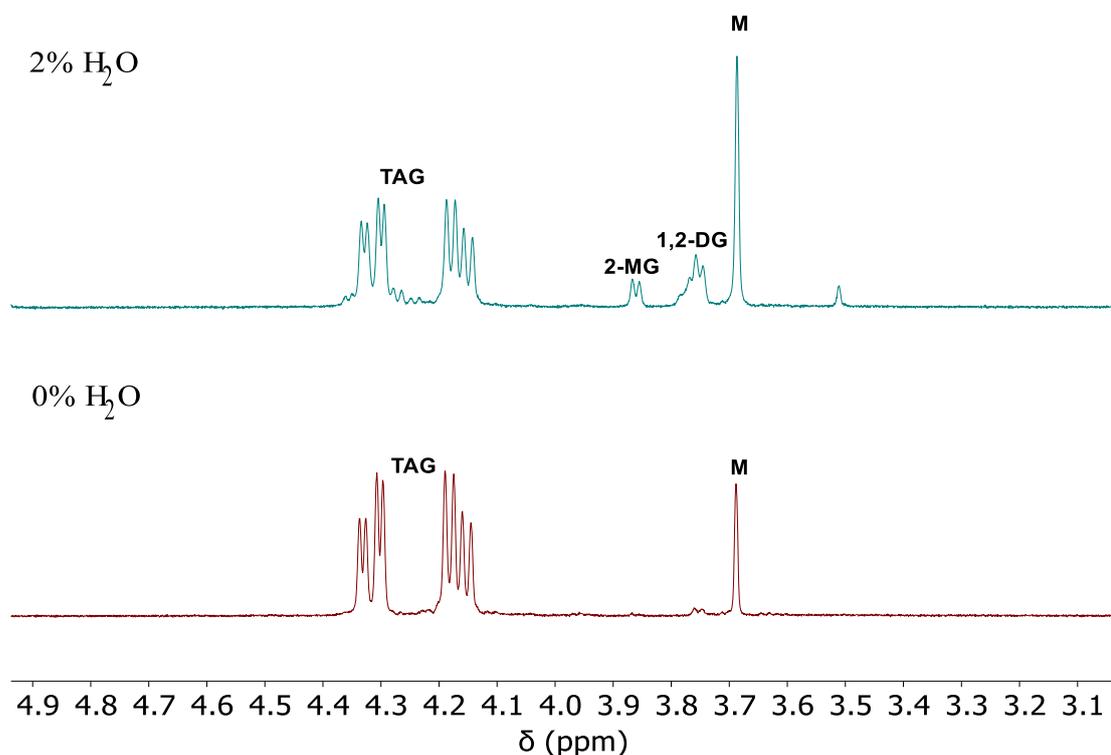


FIGURA 4. 13: Espectro de RMN de ¹H para a mistura reacional em CDCl₃ com aquisição de pontos de 16 K após 24 horas de catalise pela enzima lipase imobilizada. Em destaque estão os duplos dupletos referentes ao triacilglicerídeo (TAG), o singlete referente aos hidrogênios metílicos do FAME (M), os picos correspondentes aos produtos da hidrólise, 1,2-diglicerídeo (1,2-DG) e o 2-monoglicerídeo (2-MG).

Considerando que as lipases foram imobilizadas em solução aquosa, encontrando-se, principalmente, em sua conformação fechada, testes foram feitos na tentativa de converter a lipase imobilizada à forma aberta^{181,182}. Para isso, após a imobilização fez-se a lavagem com hexano e acetona, porém nenhuma diferença significativa foi observada na conversão do óleo de soja.

4.1.5. Imobilização enzimática

Posteriormente à definição do tipo de reação a ser usada como modelo na catálise da enzima lipase, foram realizados experimentos de otimização do processo de imobilização enzimática a partir da quimiometria. A quimiometria foi feita utilizando as três nanopartículas sintetizadas (NP-ImS₁₀, NP-Cit, NP-ImC₁₀) e outras duas nanopartículas, estando funcionalizadas com dimetilglioxima (NP-Gli) e com HPO₃ (NP-HPO). Para cada uma das nanopartículas avaliadas variou-se as condições do processo de imobilização de acordo com a matriz apresentada na TABELA 4.4. Nesta tabela também estão apresentadas as triplicatas realizadas no ponto central, que foram utilizadas para o cálculo dos erros dos efeitos de cada variável. O total de 11 experimentos foi realizado para cada nanopartícula, resultando em 55 experimentos, realizados de forma aleatória.

TABELA 4. 4: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2^{5-2} para verificar a influência de 5 variáveis da imobilização enzimática (v1 a v5) na conversão do óleo de soja a FAME.

<i>Exp.</i>	<i>v1</i> [lipase]	<i>v2</i> massa NP	<i>v3</i> Tempo	<i>v4</i> pH	<i>v5</i> [glutaraldeído]
1	-	-	-	-	-
2	+	-	-	+	+
3	-	+	-	+	+
4	+	+	-	-	-
5	-	-	+	-	+
6	+	-	+	+	-
7	-	+	+	+	-
8	+	+	+	-	+
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0

A resposta avaliada para os cálculos quimiométricos foi a porcentagem de conversão (%C) do óleo de soja a ésteres metílicos de ácidos graxos, monitorado por ressonância magnética nuclear de ^1H . Os valores de conversão para todas as nanopartículas estão apresentados na TABELA 4.5. A partir dos valores de conversão calculados, com auxílio do software GNU/Octave e a rotina computacional “fabi_efeito” descrito por Pereira e Pereira-filho¹⁸³, calculou-se a porcentagem de um efeito para cada variável, nesse cálculo não foram utilizados os valores do ponto central, apenas a matriz 8x5.

TABELA 4. 5: Valores de conversão do óleo de soja a FAME para as diferentes nanopartículas obtidos no planejamento fatorial fracionário.

<i>Exp.</i>	<i>Resposta (%C)</i>				
	<i>Fe₃O₄-Cit</i>	<i>Fe₃O₄-ImC₁₀</i>	<i>Fe₃O₄-ImSC₁₀</i>	<i>Fe₃O₄-Gli</i>	<i>Fe₃O₄-HPO₃</i>
1	1,78	6,14	1,53	5,07	3,28
2	0	0,48	0,66	0,47	4,37
3	0,64	2,12	0,41	1,20	1,62
4	2,96	9,30	2,72	8,25	6,24
5	2,57	0,24	2,57	2,17	5,04
6	0,07	2,83	0,81	0,25	5,36
7	0,23	0,47	0,80	0,75	1,88
8	0,87	7,32	2,17	2,78	1,07
9	5,93	12,38	1,90	10,78	10,48
10	3,79	12,32	1,15	9,89	16,73
11	4,03	12,36	2,09	6,00	8,79

Com os valores de conversão apresentados para o ponto central, calculou-se a variância, o erro experimental, o erro de um efeito, bem como o valor de t correspondente. A variância experimental foi calculada pela Equação 7, em que \bar{x} é a média da conversão no ponto central, n é o número de réplicas no ponto central e x_i é o valor de conversão correspondente.

$$\text{Variância Experimental} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1} \quad (6)$$

Ainda utilizando a triplicata do ponto central, calculou-se o erro experimental, utilizando a Equação 8. Partindo-se do erro experimental fez-se o cálculo do erro de um efeito através da equação 9, em que k é o número de variáveis. O erro experimental, erro de um efeito e a variância para cada nanopartícula estão dispostos na TABELA B.2 (Apêndice B).

$$\text{Erro Experimental} = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}} = \sqrt{\text{Var. Exp.}} \quad (7)$$

$$\text{Erro de um efeito} = \frac{2 \cdot \text{Erro Experimental}}{\sqrt{(n \cdot 2^k)}} \quad (8)$$

Para a triplicata feita no ponto central, ou seja, $n=3$, o número de graus de liberdade será $n-1$ (2) e o valor de t de student tabelado considerando 95% de confiança para uma distribuição bicaudal será 4,303¹⁸³. O valor de t também pode ser calculado pela função INVT do Excel. Os dados calculados até este ponto foram inseridos na rotina computacional e calculados no Octave. Como resultados dos cálculos, serão apresentados dois gráficos, o gráfico da porcentagem dos efeitos e o gráfico de probabilidade.

Os gráficos para as nanopartículas sintetizadas na presença do citrato estão apresentados na FIGURA 4.14. Pelo gráfico de porcentagem relativa dos efeitos é possível observar que apenas o pH tem efeito considerável na resposta e pelo gráfico de probabilidade confirma-se que o pH é uma variável importante, já que esta variável se encontra mais afastado do 0 no eixo X. Além disso, observa-se também que o pH apresenta um efeito negativo sobre a resposta, estando do lado negativo do eixo X. Em teoria, isso significa que quanto menor o valor de pH utilizado na imobilização melhor seria a resposta obtida, neste caso, melhor a conversão. Nota-se que todas as outras variáveis estão posicionadas dentro da área delimitada pelo intervalo de confiança, que é a área considerada para o erro de um efeito com 95% de confiança. No gráfico de probabilidade, no eixo x verifica-se

o valor teórico, em unidade, que é possível melhorar a resposta se utilizar menores valores de pH. Neste caso, pode-se melhorar a conversão em aproximadamente 2%.

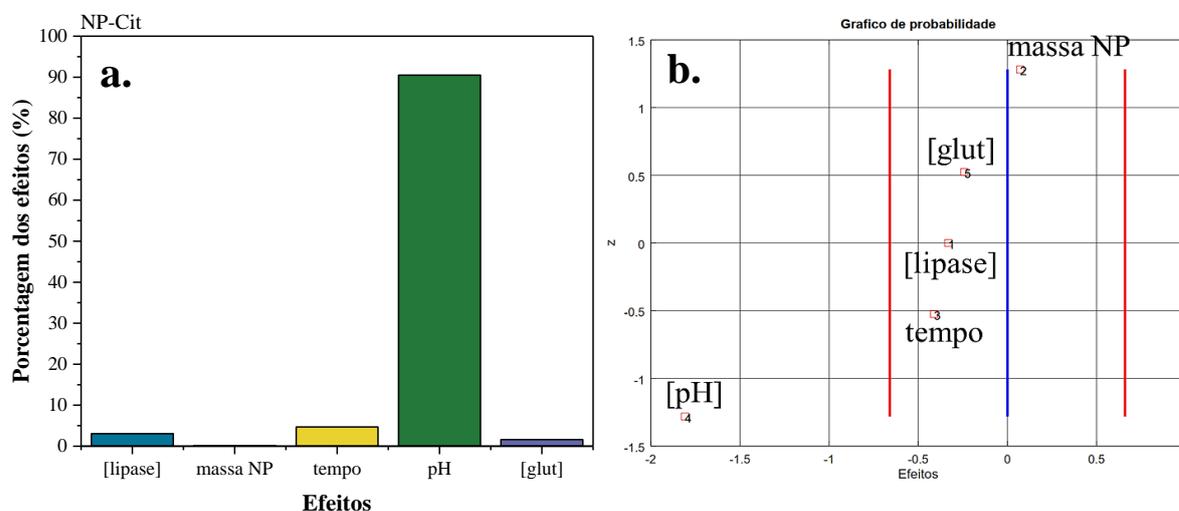


FIGURA 4. 14: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato como estabilizante ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$). A linha azul vertical mostra a posição do zero no eixo x e as duas linhas verticais vermelhas indicam o intervalo de confiança.

Na FIGURA 4.15 e FIGURA 4.16, observa-se que o perfil de resposta para as nanopartículas sintetizadas na presença dos estabilizantes catiônico e zwitteriônico foi análogo as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato, em que apenas o pH teve efeito acima de 20% e em todos os casos o pH apresentou um efeito negativo. Esse comportamento equivalente entre as nanopartículas pode ser justificado pela semelhança no método de funcionalização aplicado, nas quais apenas a quantidade de grupos funcionais se difere entre essas nanopartículas. A influência da quantidade de grupos funcionais pode ser verificada através dos gráficos de probabilidade. A nanopartícula com maior densidade de grupos amina ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) é a única que exibe um efeito positivo para a concentração de lipase, quando comparado às demais nanopartículas sintetizadas ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$).

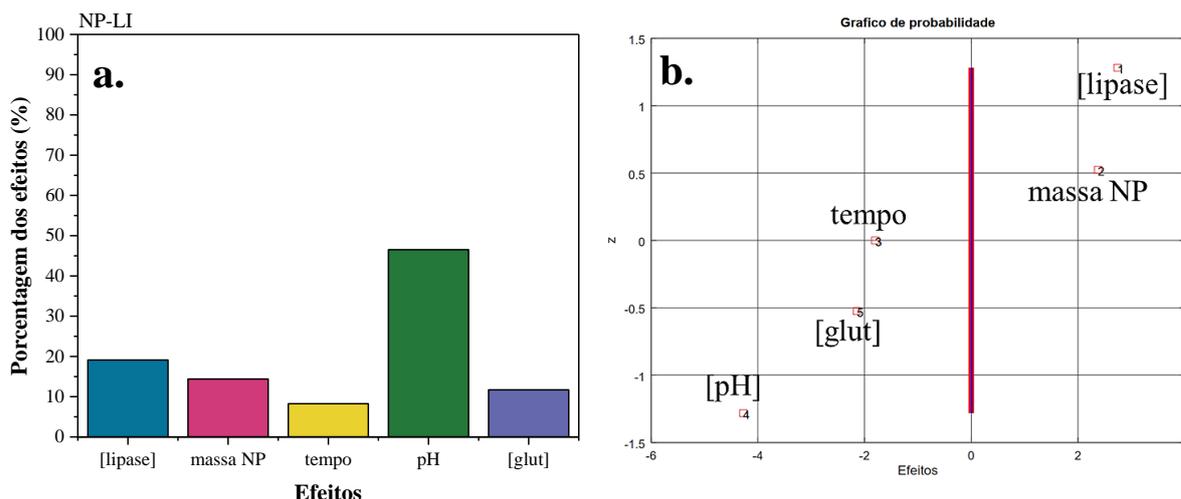


FIGURA 4. 15: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante catiônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$).

De acordo com o gráfico de probabilidade, teoricamente, é possível melhorar a conversão utilizando as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ como suporte em até 4% e as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}$ em 1,5%, ambas diminuindo o pH.

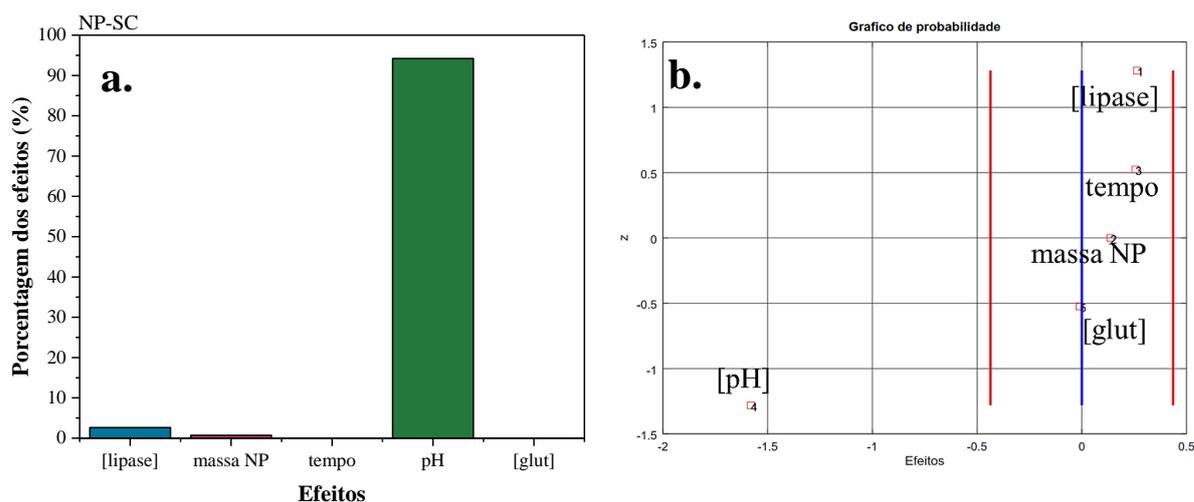


FIGURA 4. 16: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante zwitteriônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}$).

As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ apresentaram resultados semelhantes às nanopartículas sintetizadas neste trabalho e discutidas anteriormente. Apenas o pH teve efeito significativo (FIGURA 4.17-a), apresentando também um efeito negativo frente a resposta (FIGURA 4.17-b). Teoricamente, pode-se alcançar uma melhora na conversão de até 4%.

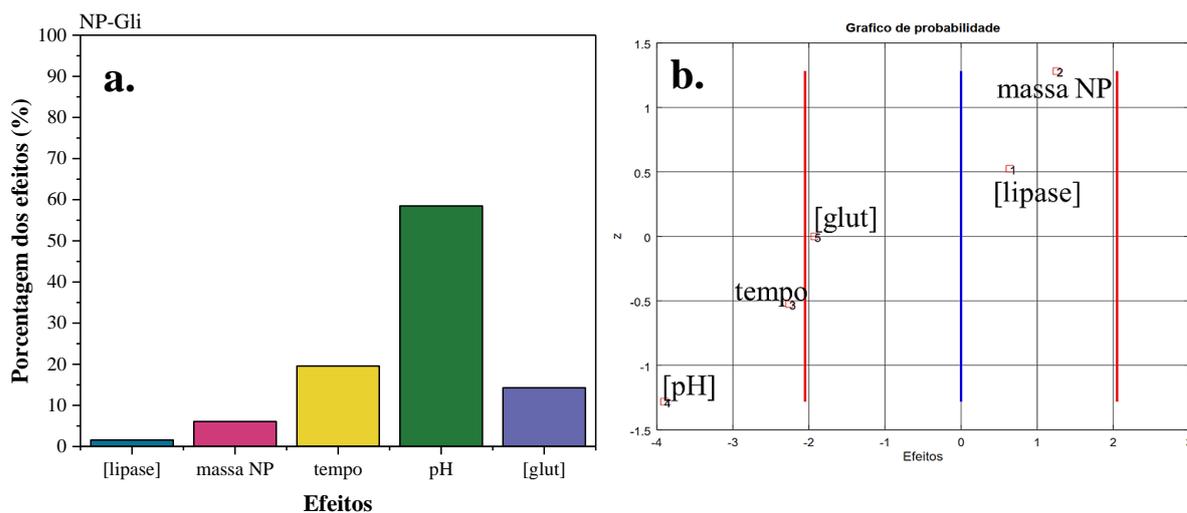


FIGURA 4. 17: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas funcionalizadas com dimetilglioxima.

Apenas as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HPO}_3$ possuem um perfil de porcentagem de efeitos distinto das demais nanopartículas, em que se observa a massa de nanopartículas utilizada como principal efeito (FIGURA 4.18). Porém ao analisar o gráfico de probabilidade verifica-se que todos os efeitos estão posicionados dentro do limite de confiança, devido à baixa reprodutibilidade da imobilização neste suporte, que pode estar associado à funcionalização superficial desta nanopartícula.

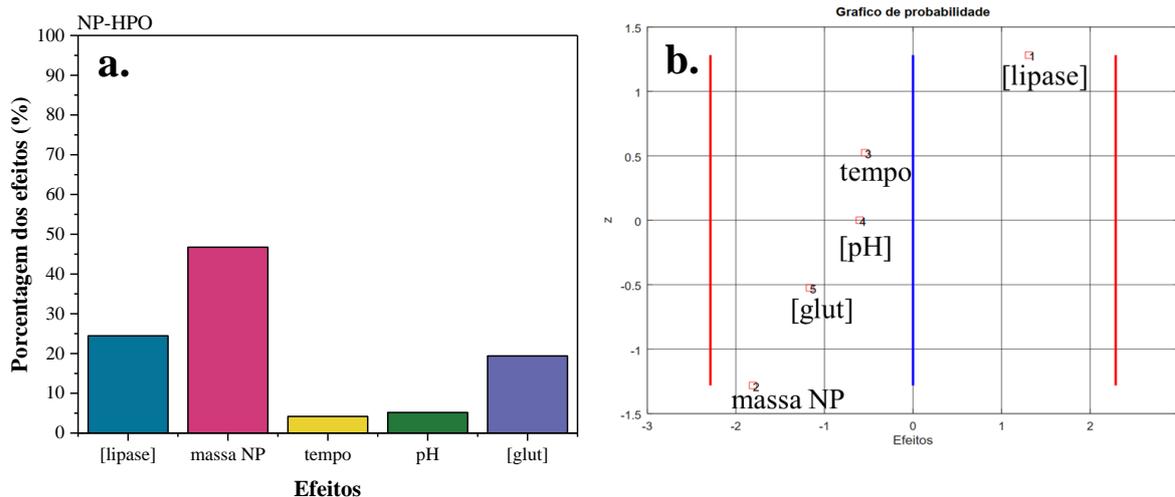


FIGURA 4. 18: Porcentagem relativa dos efeitos calculados (a) e o gráfico de probabilidade (b) para as nanopartículas funcionalizadas com HPO_3 .

Dentre todas as nanopartículas avaliadas, descartou-se as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HPO}_3$, pela baixa reprodutibilidade frente a resposta observada e a $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImSC}_{10}$, que obteve menor conversão máxima dentre todas as nanopartículas avaliadas (2,7%), como é possível observar na TABELA 4.5. As nanopartículas que tiveram continuidade nos estudos foram: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$. Para essas nanopartículas, as condições otimizadas de imobilização encontradas utilizando o planejamento fatorial fracionário estão resumidas na TABELA 4.6. Para as variáveis que não possuíram efeitos significativos foram considerados o valor do limite superior quando apresentava um efeito positivo e considerou-se o valor da variável no limite inferior quando apresentava um efeito negativo.

TABELA 4. 6: Valores otimizados das variáveis que não apresentaram efeito significativo para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$. Em parênteses está indicado se o valor da variável corresponde ao limite inferior (-) ou superior (+).

<i>Variáveis</i>	<i>Nanopartículas</i>		
	<i>Fe₃O₄-Cit</i>	<i>Fe₃O₄-ImC₁₀</i>	<i>Fe₃O₄-Gli</i>
<i>[Lipase] / mg mL⁻¹</i>	0,5 (-)	1,0 (+)	1,0 (+)
<i>Massa de NPs / mg</i>	15,0 (+)	15,0 (+)	15,0 (+)
<i>Tempo / min.</i>	10,0 (-)	10,0 (-)	10,0 (-)
<i>[Glutaraldeído] / μL</i>	5,0 (-)	5,0 (-)	5,0 (-)

4.1.6. Otimização do pH de Imobilização

Como para as nanopartículas de Fe₃O₄-ImC₁₀, Fe₃O₄-Cit e Fe₃O₄-Gli apenas o pH foi uma variável com porcentagem de efeito significativo, avaliou-se diferentes valores de pH. Dado que para todas essas nanopartículas, o pH apresentou efeito negativo para melhora na conversão da reação de hidroesterificação, avaliou-se a imobilização no pH 3, 4, 5 e 6. Na Figura 4.19 observa-se que em valores de pH abaixo do limite inferior as enzimas imobilizadas em diferentes nanopartículas apresentaram menor conversão, e não foi verificado uma melhora como previsto pelos cálculos quimiométricos. Isso ocorreu porque apesar de diminuir o empiricismo acerca do processo de imobilização, em pH muito baixo ocorre a desnaturação da enzima e consequente diminuição da conversão. Este fato não é considerado nos cálculos quimiométricos.

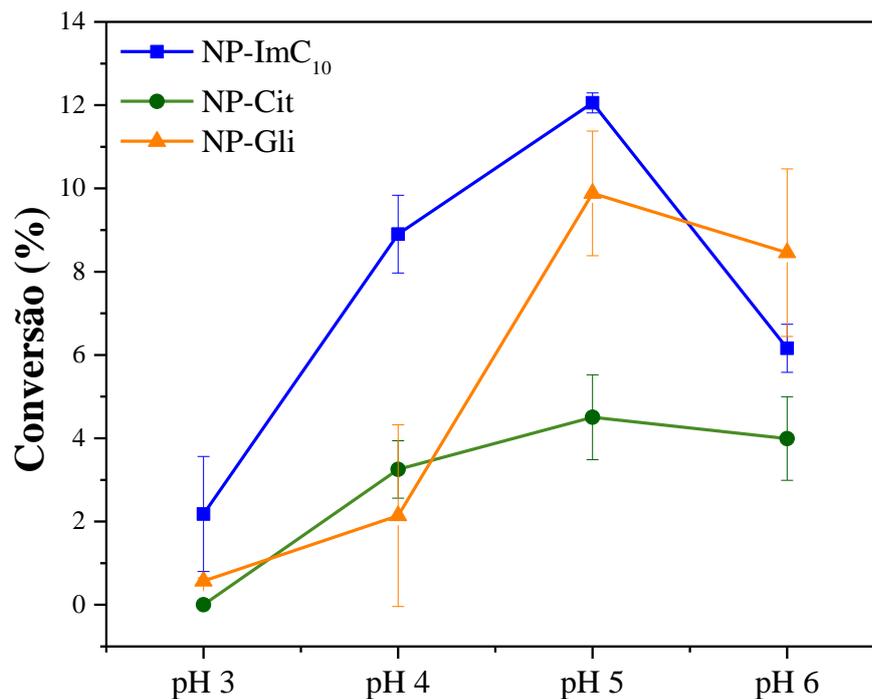


FIGURA 4. 19: Otimização do pH de imobilização frente a hidroesterificação do óleo de soja a FAME.

O pH de imobilização que alcançou maior conversão foi o pH 5 que é o pH mais próximo do ponto isoelétrico da enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens* ($pI = 4,7$). A maior conversão neste pH pode estar associada à maior carga enzimática no suporte magnético, ou seja, maior número de enzimas imobilizadas, já que no ponto isoelétrico se observa a adsorção máxima das enzimas no suporte¹⁸⁴ considerando uma adsorção não-eletrostática, uma vez que a adsorção no suporte é a etapa fundamental na metodologia adotada de imobilização, como representado na FIGURA 4.20.

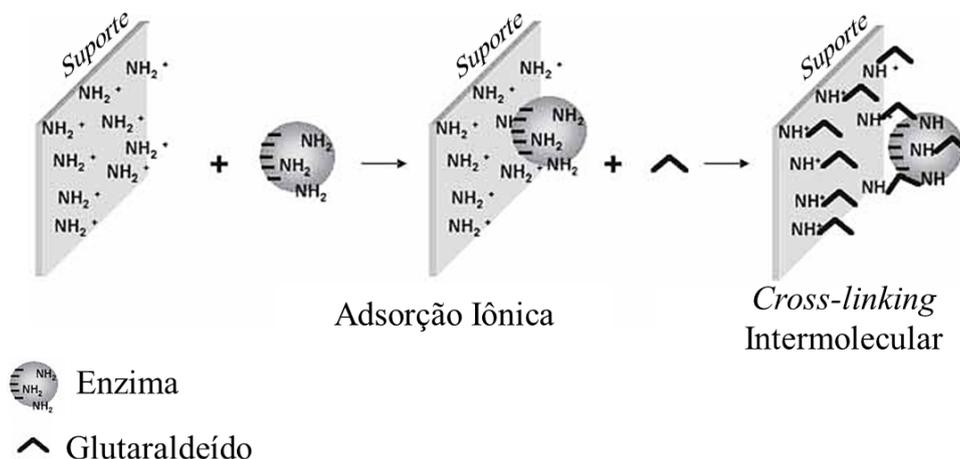


FIGURA 4. 20: Ilustração esquemática do cross-linking com glutaraldeído de proteínas adsorvidas iônica em suportes catiônicos aminados. Fonte:

Adaptado de Betancor et al. (2006)¹⁸⁵.

4.1.7. Estudo de Atividade Hidrolítica e Estabilidade da Enzima Imobilizada

A atividade da enzima imobilizada nos suportes magnéticos e livre foi investigada frente a reação de hidrólise do óleo de oliva com a finalidade de avaliar a atividade residual da enzima após a imobilização da mesma no suporte. Com a atividade enzimática calculou-se o rendimento de imobilização (RI) em termos da atividade hidrolítica pela Equação 9¹⁸⁷. Onde, A_0 é a atividade inicial da solução de enzima antes da imobilização e A_f é a atividade do sobrenadante após a imobilização. O rendimento de imobilização calculado foi 60, 66 e 78% para as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, respectivamente.

$$RI = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \times 100 \quad (9)$$

O cálculo da atividade enzimática ($U\ g^{-1}$ do suporte) foi calculado pela Equação 10 e a atividade recuperada após a imobilização foi calculado pela Equação 11.

$$\textit{Atividade enzimática} = \frac{\textit{Atividade da enzima imobilizada (U)}}{\textit{Massa do suporte (g)}} \quad (10)$$

$$\textit{Atividade Recuperada (\%)} = \frac{\textit{Atividade da enzima imobilizada}}{A_0 - A_f} \cdot 100 \quad (11)$$

A atividade da enzima imobilizada nos diferentes suportes está apresentada na FIGURA 4.21. Observa-se que a atividade recuperada (apresentado em laranja) é igual ou maior a 100%, indicando que não ocorreu desnaturação significativa da enzima durante o processo de imobilização. Já os valores de atividade recuperada maiores que 100% pode estar associado a formação de dímeros quando a enzima se encontra em solução, logo, a atividade inicial da solução de enzima é menor que a atividade real da solução. Nota-se também que a atividade da enzima imobilizada (representado em verde na FIGURA 4.21) são semelhantes para as nanopartículas sintetizadas na presença de citrato e do estabilizante catiônico mesmo utilizando diferentes concentrações da solução de enzima ($0,5\ mg\ mL^{-1}$ para Fe_3O_4 -Cit e $1,0\ mg\ mL^{-1}$ para Fe_3O_4 -ImC₁₀). Esse fato pode estar relacionado a aglomeração excessiva das proteínas no bioconjugado da nanopartícula de Fe_3O_4 -ImC₁₀, uma vez que não há controle sobre a densidade de empacotamento das enzimas imobilizadas⁵³. Esta aglomeração excessiva está associada a formação de cross-linking intermolecular entre as enzimas presentes na solução que está diretamente relacionado a concentração da solução de proteína utilizada na imobilização¹⁸⁶. Observa-se que o maior rendimento de imobilização levou a maior atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas como observado na FIGURA 4.21.

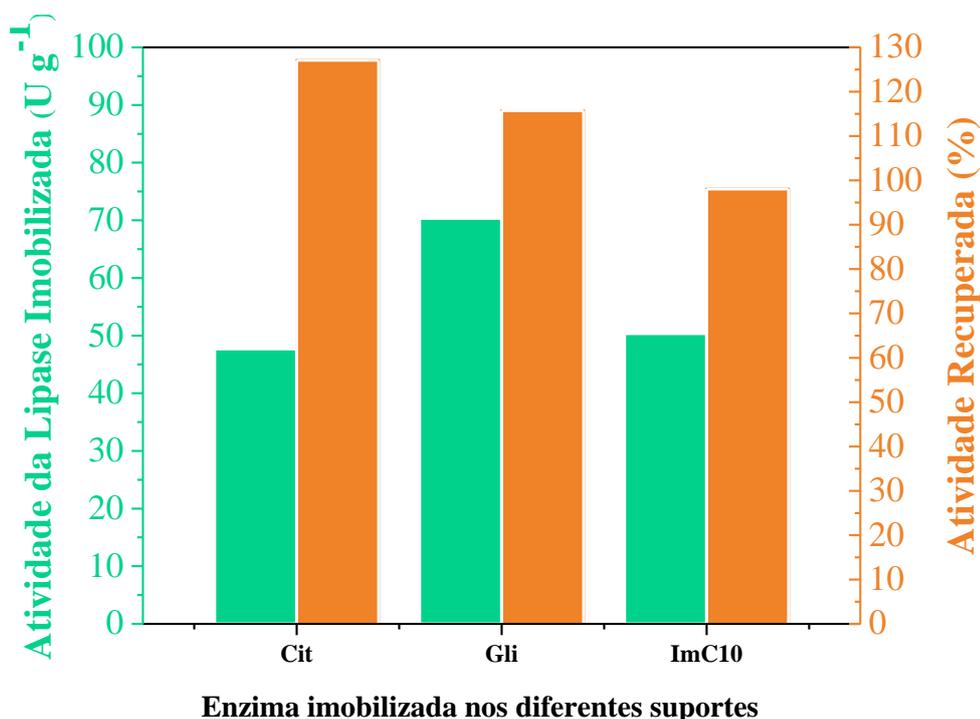


FIGURA 4. 21: Atividade enzimática da enzima lipase imobilizada nos suportes magnéticos expressos em U g⁻¹ e a atividade recuperada da enzima imobilizada.

Considerando que durante o processo de imobilização ocorre também a adsorção física das enzimas devido as cargas do suporte e do biocatalisador, após a imobilização, o bioconjugado foi lavado com tampão com elevada força iônica e o sobrenadante foi avaliado frente a hidrólise do óleo de oliva. Na FIGURA 4.22, estão apresentadas as atividades relativas do sobrenadante de imobilização e do sobrenadante após a lavagem com tampão 0,5 M calculado em relação a atividade da solução inicial de enzima (0,5 mg L⁻¹ para Fe₃O₄-Cit e 1,0 mg L⁻¹ para Fe₃O₄-ImC₁₀ e Fe₃O₄-Gli). Observa-se que os suportes Fe₃O₄-ImC₁₀ e Fe₃O₄-Gli apresentaram menores atividades do sobrenadante após a lavagem com tampão de elevada força iônica. Desta forma, acredita-se que menores quantidades de enzima foram imobilizadas por adsorção nestas enzimas. Por outro lado, para o suporte Fe₃O₄-Cit, verifica-se uma maior quantidade de enzima adsorvida, possivelmente devido à uma maior carga líquida superficial já que a mesma apresentou menor funcionalização. Verifica-se, portanto, que a

maior atividade enzimática da lipase imobilizada na $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ está associada à uma ligação covalente.

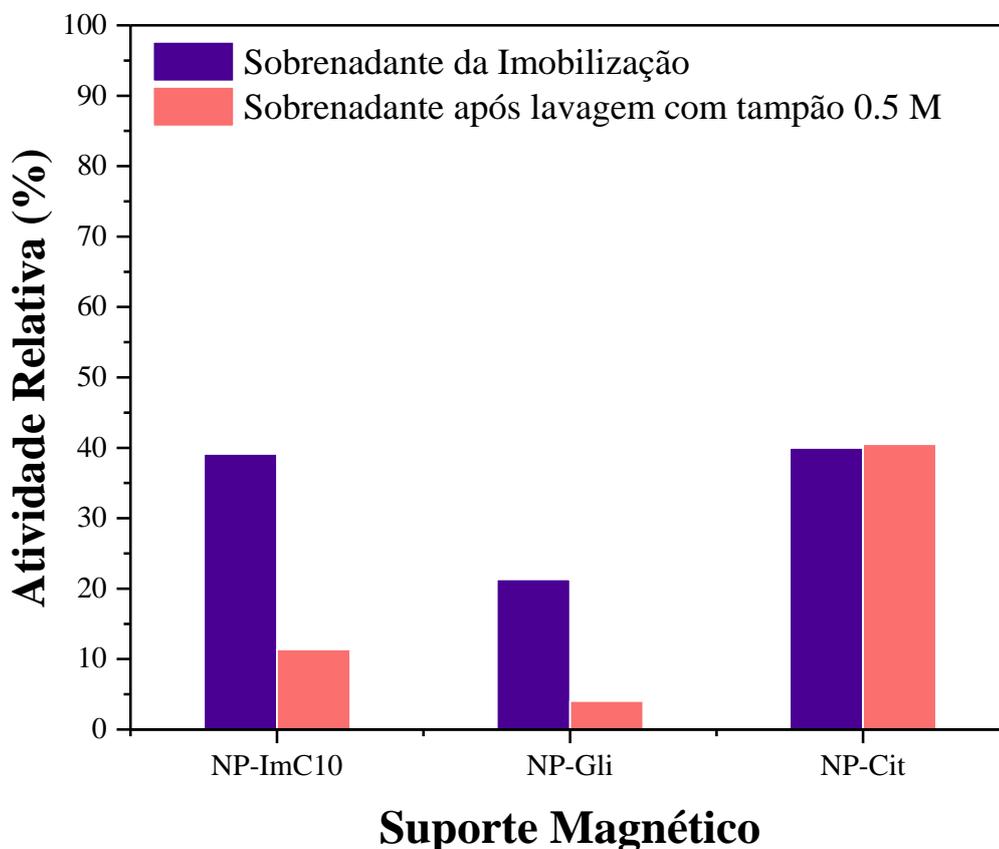


FIGURA 4. 22: Atividade relativa do sobrenadante de imobilização e do sobrenadante após a lavagem com tampão 0,5 M em função da solução inicial de enzima usado na imobilização.

Após estudar a atividade enzimática da enzima imobilizada, investigou-se sua estabilidade térmica. No gráfico da FIGURA 4.23 estão apresentadas as atividades relativas da enzima imobilizada e da enzima livre em diferentes tempos de incubação a 45°C. Observa-se um rápido decaimento na atividade da enzima livre em contraste com a enzima imobilizada. Isso ocorre devido a estrutura mais rígida da enzima imobilizada, dificultando sua desnaturação^{188,189} e mantendo sua atividade por maior período de tempo sob 45°C. Em todos os suportes avaliados, verifica-se uma diminuição na atividade da

enzima de aproximadamente 20%. Já a enzima livre exibiu quase 80% de inativação térmica, quando submetido a 45 graus por 90 minutos.

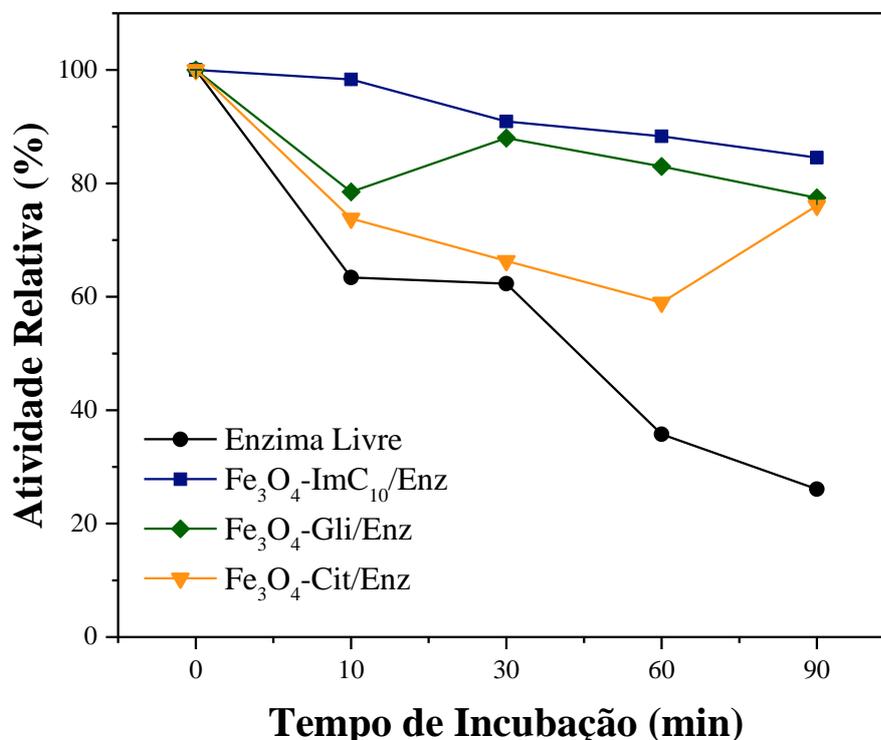


FIGURA 4. 23: Efeito do tempo de incubação a 45°C na atividade da enzima lipase livre e imobilizada nos suportes magnéticos (Fe₃O₄-ImC₁₀, Fe₃O₄-Cit e Fe₃O₄-Gli) durante diferentes tempos de incubação em pH 8,0.

Com os dados da estabilidade térmica calculou-se as constantes de desativação térmica através da Equação 12¹⁸⁸, onde A_0 é a atividade inicial, A_t é a atividade após o tratamento térmico em t minutos.

$$\ln A_t = \ln A_0 - K_d(t) \quad (12)$$

Os valores da constante de desativação estão expostos na TABELA 4.6. Nota-se que as maiores constantes estão associadas a enzima livre, demonstrando que maior resistência a inativação térmica da enzima imobilizada.

TABELA 4. 7: Constante de desativação térmica para a enzima livre e imobilizada a 45 °C em diferentes intervalos de tempo.

<i>Tempo</i> (<i>min</i>)	<i>Constante de Desativação Térmica a 45°C</i>			
	Enzima Imobilizada			Enzima Livre
	<i>Fe₃O₄-ImC₁₀</i>	<i>Fe₃O₄-Cit</i>	<i>Fe₃O₄-Gli</i>	
10	0,0567	0,7827	0,4319	0,8346
30	0,3559	1,1971	0,2176	0,4731
60	0,4882	0,5276	0,3252	1,0286
90	0,7149	0,6846	0,4584	1,3434

4.1.8. Caracterização Morfológica por TEM das Nanopartículas Otimizadas

Para compreender melhor a diferença no comportamento da enzima lipase imobilizada nas diferentes nanopartículas magnéticas, foram registradas imagens de microscopia de transmissão (TEM) dos suportes (Fe_3O_4 -ImC₁₀, Fe_3O_4 -Cit e Fe_3O_4 -Gli), visto que não foi possível coletar imagens de MEV para estes materiais previamente ao recobrimento.

Para os suportes magnéticos funcionalizados com APTS/dimetilglioxima observa-se na FIGURA 4.24a presença de nanopartículas pouco aglomeradas com tamanho médio de partícula de 9,1 ($\pm 2,0$) nm com uma fina camada de revestimento amorfo de sílica (menor que 1 nm), FIGURA 4.24.

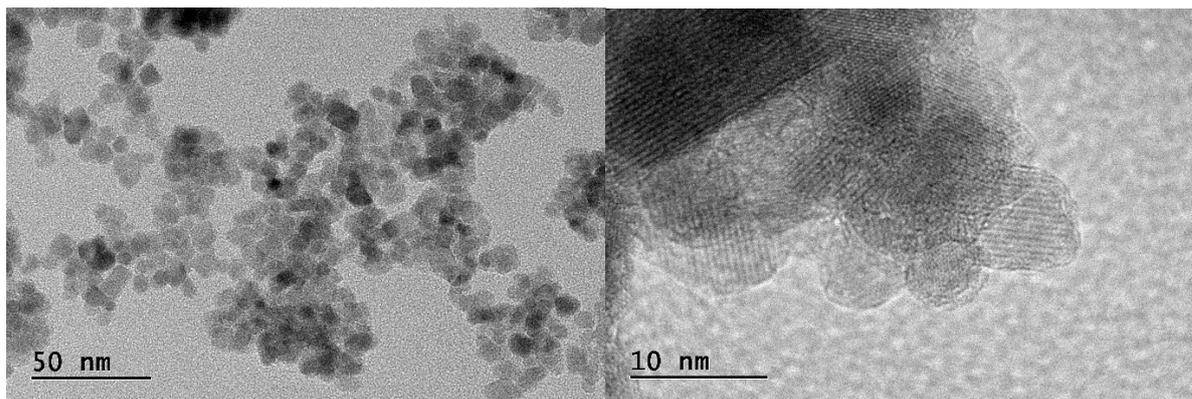


FIGURA 4. 24: Imagens de microscopia de transmissão do suporte magnético de Fe_3O_4 recoberto com sílica (SiO_2) ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$) em diferentes ampliações.

A FIGURA 4.25 apresenta as imagens de TEM para as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante aniônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$). Observa-se aglomerados de nanopartículas revestidas com uma camada de sílica com espessura de 8 nm. Esses aglomerados magnéticos recobertos atingem até 350 nm de tamanho. Nas imagens pode-se observar também que há a presença de nanopartículas de SiO_2 sem o núcleo magnético de magnetita que foram formados durante o processo de recobrimento. Nas regiões indicadas na FIGURA 4.25, constata-se a presença de núcleos magnéticos menores, indicando que a aglomeração das nanopartículas ocorrem no processo de recobrimento, corroborando com os resultados discutidos na seção 4.1.3.

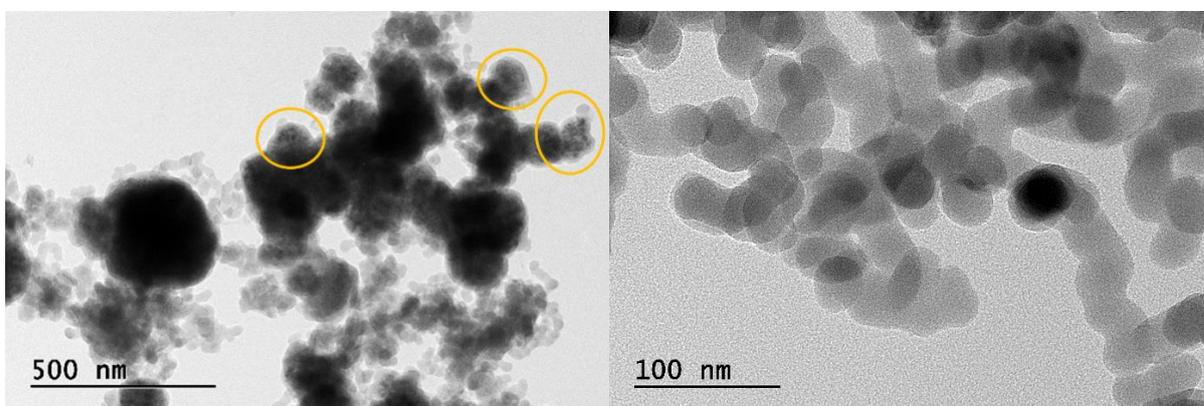


FIGURA 4. 25: Imagens de microscopia de transmissão do suporte magnético de Fe_3O_4 sintetizado com estabilizante aniônico e recoberto com sílica ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$) em diferentes ampliações.

As imagens de TEM para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, apresentadas na FIGURA 4.26, demonstram que no processo de recobrimento ocorreu a formação de aglomerados de nanopartículas magnéticas revestidos com uma camada de sílica, gerando objetos de 105 (± 25) nm e uma camada de sílica de 22 nm. Diferentemente da nanopartícula $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$, não se observam nanopartículas de SiO_2 sem o núcleo magnético, verificando um recobrimento mais uniforme dos aglomerados magnéticos. Em algumas regiões da imagem, nota-se também a presença de núcleos magnéticos menores, em maior escala do que foi observado para as nanopartículas $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$.

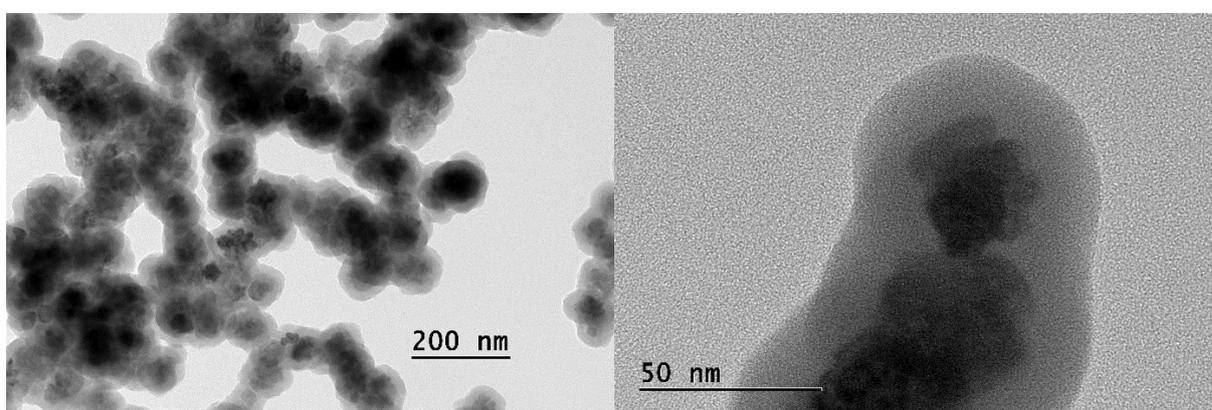


FIGURA 4. 26: Imagens de microscopia de transmissão do suporte magnético de Fe_3O_4 sintetizado na presença do estabilizante catiônico e recoberto com SiO_2 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) em diferentes ampliações.

Relacionando os resultados obtidos pelas imagens de TEM com a atividade da enzima imobilizada, observa-se que melhores atividades são alcançadas para as nanopartículas que apresentaram menor tamanho após recobertas, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$. Isso ocorre devido a maior carga enzimática na superfície do suporte que está associado a maior área do superficial do

mesmo¹⁹⁰. Corroborando com esses fatos, obteve-se maior atividade enzimática utilizando a nanopartícula de Fe₃O₄-Gli que apresentou menor tamanho de partícula.

4.1.9. Otimização dos Substratos

O efeito da quantidade e do tipo de substrato acil receptor foi estudado para a enzima imobilizada nas nanopartículas funcionalizadas com dimetilglioxima (Fe₃O₄-Gli), já que este suporte apresentou melhor atividade frente a hidrólise de óleo de oliva como discutido na *seção 4.1.7*. Nesta etapa, variou-se a quantidade de óleo de soja utilizando etanol e metanol como substrato, afim de verificar se utilizando um álcool menos desnaturante haveria mudanças na eficiência de conversão. O cálculo da conversão utilizando etanol foi feito utilizando ¹H RMN, como descrito anteriormente. A conversão utilizando etanol também foi monitorado por ¹H RMN, verificando os sinais dos ésteres etílicos de ácido graxo (FAEE – *Fatty Acid Ethyl Ester*). O cálculo da conversão foi feito utilizando a equação 13¹⁹¹, na qual aplica-se o valor da integral do conjunto de sinais dos hidrogênios metilênicos do triacilglicerídeo (I_{TAG}), encontrados na faixa de 4,25-4,35 ppm, e no valor da integral do multiplete dos hidrogênios metilênicos e dos hidrogênios do grupo etóxido – CH₂ (I_{TAG+EE}), que se encontram sobrepostos em 4.10-4.20 ppm

$$C_{EE} = 100 \cdot \left[\left(\frac{I_{TAG+EE} - I_{TAG}}{I_{TAG+EE} + 2I_{TAG}} \right) \right] \quad (13)$$

Na FIGURA 4.27 estão apresentados os dados de conversão variando a quantidade de óleo de soja e o álcool utilizado. É possível observar no gráfico apresentado na FIGURA 4.27 que a utilização do etanol, que é um álcool menos desnaturante^{192,193}, não influenciou na melhora de conversão do óleo de soja a ésteres alquílicos de ácido graxo, visto que cada enzima lipase possui

especificidade diferente em relação aos seus substratos¹⁹³. O maior valor de conversão foi $\approx 25\%$ obtido a partir da utilização de 250 μL de óleo de soja e metanol na proporção 1:4. Apesar da diferença entre os bioconjugados, o maior rendimento da reação de conversão e a obtenção de melhores rendimentos utilizando metanol ao invés de etanol também foi observado para lipase de *Cândida antarctica* imobilizada em uma resina macroporosa¹⁹³.

Observa-se na FIGURA 4.27 que atingiu um máximo de conversão utilizando 200 e 250 μL de óleo de soja quando utilizado como acil receptor o etanol e metanol, respectivamente. Após este máximo alcançado observa-se a diminuição acentuada na conversão, que pode estar associado a saturação do biocatalizador. Em todos os substratos observa-se uma diminuição da conversão quando há o aumento no volume do substrato, este fato está associado a desnaturação da enzima devido a saturação do biocatalizador imobilizado e a ação desnaturante dos acil receptores que não reagiram e foram se acumulando no decorrer da reação.

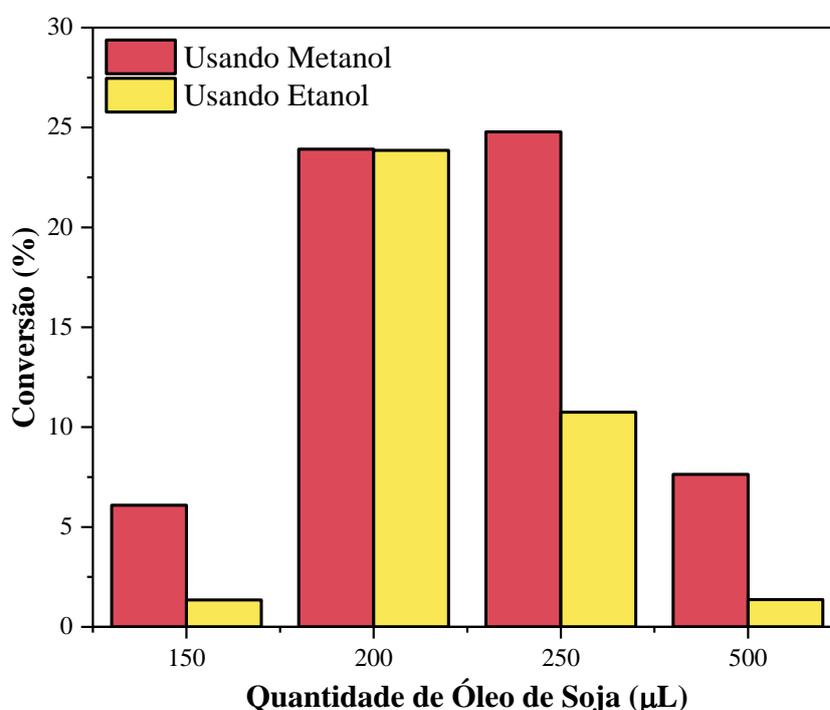


FIGURA 4. 27: Avaliação do efeito da quantidade de substrato frente a conversão do óleo de soja à ésteres de ácido graxo pela reação de hidrólise

seguido de esterificação: quantidade de óleo avaliado na faixa de 150-500 μL utilizando metanol e etanol como acil receptor na proporção 1:4.

Na Figura 4.27, nota-se que ao se utilizar 200 μL de óleo de soja obtêm-se conversão semelhante utilizando etanol e metanol. Deste modo, seria interessante o uso de etanol como substrato para a catálise visto que a eficiência de conversão obtida quando utilizado esse acil receptor não apresentou diferenças significativas na conversão máxima em comparação à utilização de metanol. Além disso, a aplicação de etanol tornaria o processo de obtenção de ésteres alquílicos de ácido graxo mais verde, já que pode ser obtido a partir de fontes renováveis¹⁹². Porém, no ^1H RMN, os sinais dos produtos da primeira etapa da reação de hidroesterificação (monoglicerídeo $\approx 4,18\text{ppm}$; diglicerídeo $\approx 4,28\text{ppm}$)¹⁸⁰ podem estar sobrepostos aos sinais na faixa de 4,10 a 4,35 ppm, utilizados no cálculo de conversão do óleo de soja a FAEE, acarretando no erro associado a conversão calculada pela Equação 13. Por este motivo adotou-se o metanol como acil receptor.

4.1.10. Avaliação da Temperatura de Catálise

Após o estudo dos nanoconjugados e investigação do melhor substrato para a reação de hidrólise seguido de esterificação, avaliou-se a influência do aumento de temperatura na taxa de conversão do óleo de soja a FAME. Considerando os resultados apresentados, como baixa conversão mesmo na condição otimizada e atividade relativamente baixa da enzima imobilizada, a otimização da temperatura não foi feita para a nanopartícula sintetizada na presença do estabilizante aniônico, para os demais suportes utilizou-se baixa concentração de enzima na imobilização ($0,067 \text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{suporte}}$), visto que os suportes apresentaram pouca funcionalização e um quantidade considerável de enzima adsorvida na superfície.

Na FIGURA 4.28, estão apresentadas as conversões do óleo de soja a FAME nas temperaturas avaliadas (37, 47 e 57 °C) para as enzimas imobilizadas nas diferentes nanopartículas magnéticas. Observa-se, FIGURA 4.28-a, que maiores conversões foram alcançadas para a enzima imobilizada na nanopartícula sintetizada na presença do estabilizante catiônico, para todas as temperaturas avaliadas. O máximo de conversão ($\approx 45\%$) foi obtido para a catálise a 47°C. O aumento da temperatura de catálise resultou em uma diminuição significativa na conversão, devido a desnaturação da enzima imobilizada^{194,195}. Já para as nanopartículas funcionalizadas com dimetilglioxima, o máximo de conversão alcançado foi de $\approx 25\%$ a 37°C, a partir desta temperatura baixas conversões foram verificadas.

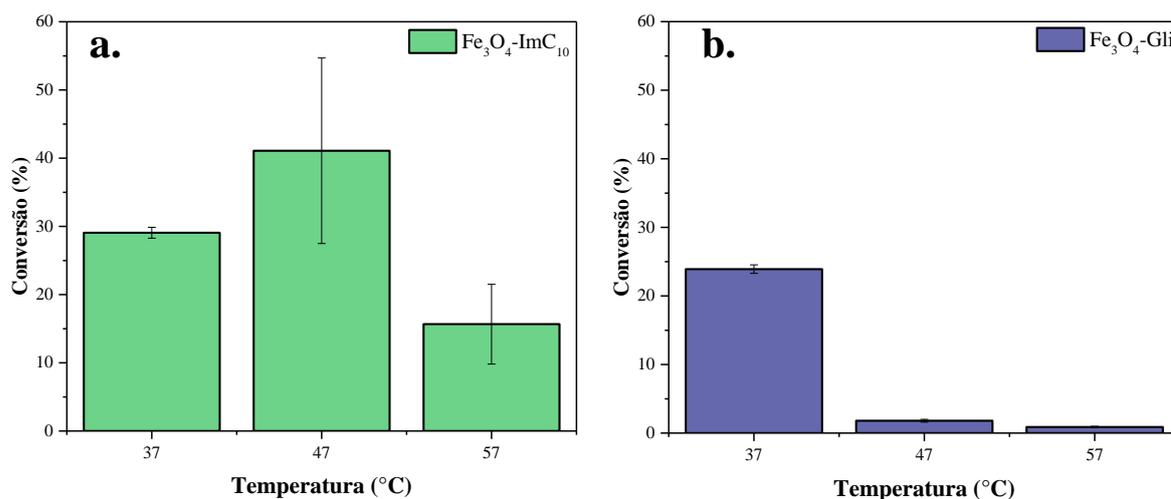


FIGURA 4. 28: Conversões do óleo de soja a FAME em diferentes temperaturas (37, 47 e 57 °C) para as enzimas imobilizadas no suporte Fe₃O₄-ImC₁₀(b) e Fe₃O₄-Gli (a).

A diferença no comportamento da enzima imobilizada frente ao aumento da temperatura pode estar associada a funcionalização do suporte, uma vez que o tipo de interação/ligação entre a enzima e o suporte pode influenciar diretamente nas propriedades catalíticas, principalmente na estabilidade térmica da enzima⁴⁹. Ao avaliar o espectro da enzima imobilizada na região do

infravermelho (FIGURA B.3), observa-se que a banda de amida I inicialmente localizada em 1651 cm^{-1} é deslocada para 1630 cm^{-1} , 1662 cm^{-1} e 1641 cm^{-1} quando imobilizada em $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, respectivamente. A região de amida I é responsável por explicitar alterações da estrutura secundária, em que a lipase livre apresenta maior concentração de alfa hélices, enquanto que após a imobilização, um conteúdo de folhas beta aumenta para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$. A partícula $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ ocasiona em um aumento de torções do tipo beta. Verifica-se também um maior deslocamento das bandas relacionadas à amida II e amida III de 1545 cm^{-1} e 1454 cm^{-1} na enzima livre para 1580 e 1400 cm^{-1} na $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, 1571 e 1400 cm^{-1} na $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e 1568 e 1445 cm^{-1} na $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, indicando grandes variações na estrutura secundária da enzima que favoreceram a estabilidade térmica e a atividade de hidroesterificação.

Para a hidroesterificação do óleo de soja, mesmo a 37°C observa-se que a enzima imobilizada no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ apresentou maior conversão, apesar de ter verificado maior atividade frente a hidrólise do óleo de oliva para a enzima imobilizada na nanopartícula funcionalizada com dimetilglioxima ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$). Este fato pode ser atribuído a uma carga excessiva de enzima no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, que provoca a deformação e/ou compressão da proteína limitando o acesso de substratos maiores^{49,196}.

O estudo da enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada como catalisador para a obtenção de ésteres alquílicos de ácido graxo utilizando óleo vegetal como substrato, também foi feito por Ferrero e colaboradores¹⁹⁷. Neste trabalho os autores utilizaram da transesterificação como reação a ser catalisada pela enzima e obtiveram conversão máxima de 97% após 48 horas de reação. Apesar do elevado rendimento, foram utilizadas altas concentrações de enzima ($0,4\text{ mg}_{\text{enzima}}/\text{mg}_{\text{suporte}}$) e o suporte avaliado foi uma sílica mesoporosa (SBA-15).

Um estudo semelhante foi realizado por Cubides-Roman e colaboradores¹⁹⁸, em que imobilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* em

dois suportes diferentes, quitosana e nanopartículas magnéticas funcionalizadas com quitosana. A enzima imobilizada foi então avaliada para a reação de transesterificação do óleo de coco com etanol em um reator assistido por campo magnético, para o qual, obteve a maior conversão de 97,8% em 72 h para a enzima imobilizada em nanopartícula magnética.

Resultados interessantes foram obtidos por Lima et al.¹⁸⁷, no qual avaliaram diferentes óleos vegetais frente a transesterificação utilizando etanol. Os autores observaram a conversão quase completo em 24 horas do óleo com menor massa molecular (óleo de babaçu), ademais para o óleo de soja um rendimento de 80% foi obtido em 48 horas utilizando a enzima de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em partículas hidrofóbicas de sílica (5 mg_{enzima}/g_{suporte}).

Diante dos trabalhos apresentados, a máxima conversão do óleo de soja a ésteres alquílicos de ácido graxo alcançado neste trabalho ($\approx 45\%$ a 47°C), está de acordo com os valores relatados na literatura considerando o tempo de reação (24 horas), a concentração de enzima utilizado na imobilização (0,067 mg_{enzima}/g_{suporte}) e a concentração do bioconjugado de 6% (m:m) no meio reacional.

4.1.11. Reciclagem do Biocatalisador Imobilizado

A conversão nos diferentes ciclos de reciclagem do biocatalisador imobilizado estão apresentados na FIGURA 4.29. Observa-se um comportamento semelhante para todos os suportes, em que a conversão se manteve aparentemente constante nos 5 ciclos avaliados. Apenas para o suporte Fe₃O₄-Cit nota-se uma diminuição significativa na conversão após o terceiro ciclo de reciclagem, que pode estar associado ao fato deste suporte possuir maior quantidade de enzima adsorvida, como demonstrado na seção 4.1.7, e a lixiviação dessas enzimas que não foram covalentemente ligadas ao suporte leva a diminuição da conversão do óleo de soja.

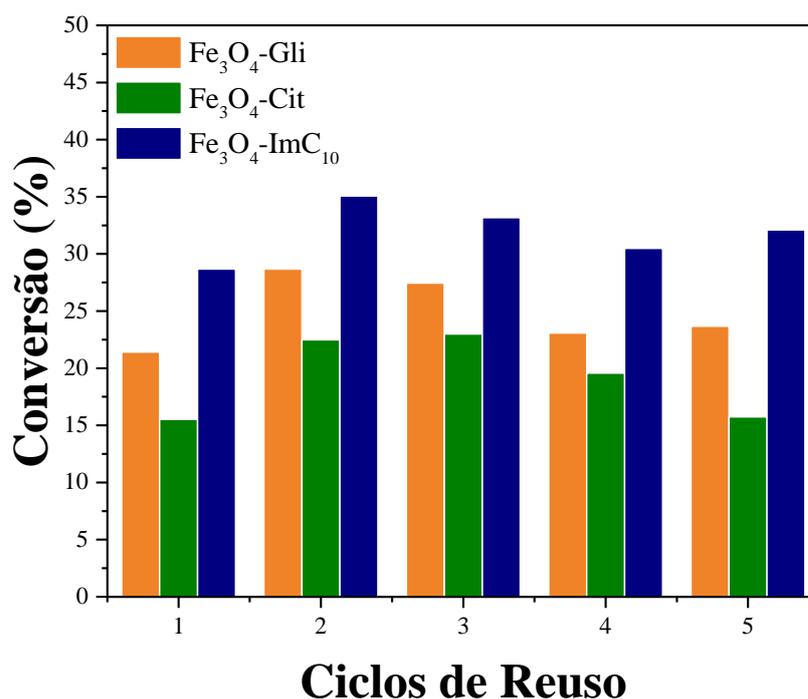


FIGURA 4. 29: Estudo de reciclagem dos sistemas de lipase imobilizada nos diferentes suportes magnéticos.

4.1.12. Reuso do Suporte

Apesar da imobilização enzimática agregar vantagens a utilização de enzimas, o custo associado a síntese e funcionalização do suporte adiciona custos ao processo de funcionalização. Uma alternativa para minimizar os custos é a estratégia de reutilização do suporte após a desnaturação da enzima imobilizada. Neste sentido foi avaliado o melhor tempo de hidrólise para total desprendimento da enzima imobilizada.

Inicialmente foi avaliado o melhor tempo de hidrólise para liberação da enzima imobilizada. Para isso utilizou-se as nanopartículas de Fe₃O₄-ImC₁₀, que apresentaram maior densidade de grupos aminas (Seção 4.1.3). Na FIGURA 4.30 estão apresentados os espectros de FTIR para o suporte com a enzima imobilizada após ser submetido a diferentes tempos de hidrólise e observa-se que em 30 minutos de hidrolise já é possível verificar o desaparecimento das bandas

atribuídas a presença da enzima imobilizada. A liberação da enzima em 30 minutos de hidrólise também pode ser verificada na FIGURA 4.31 que apresenta os espectros de absorvância do sobrenadante do processo de hidrólise, demonstrando que o máximo de absorção já é alcançado em 30 minutos de hidrólise.

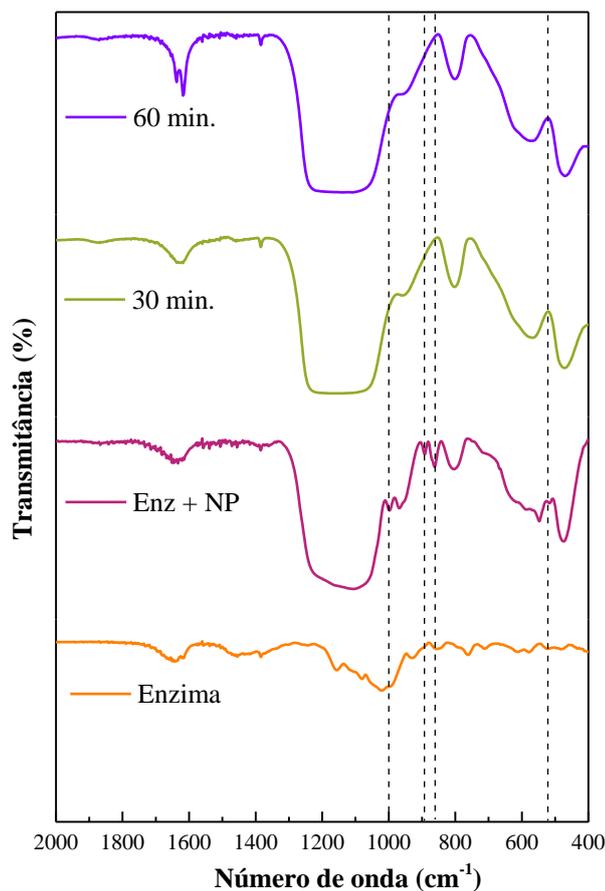


FIGURA 4. 30: Espectros de FTIR da enzima livre e do suporte ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) com a enzima lipase imobilizada, após passar por diferentes tempos de hidrólise.

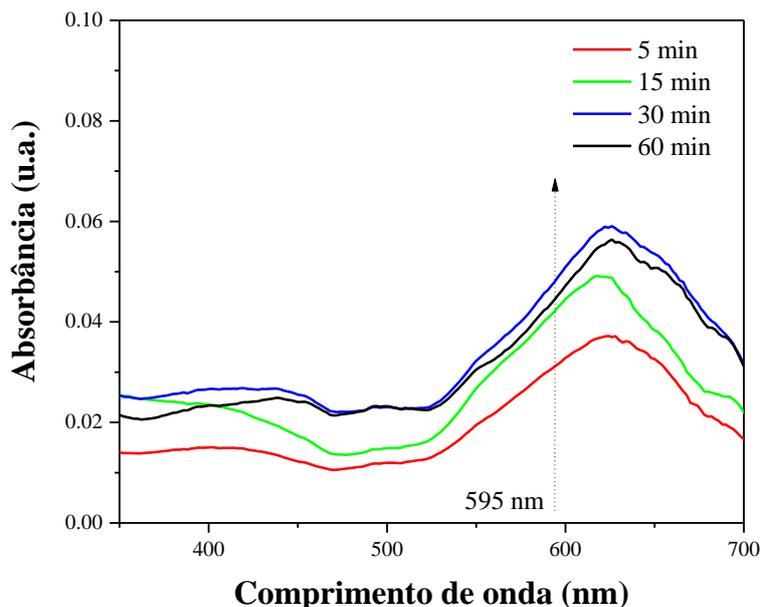


FIGURA 4. 31: Espectro de absorção UV-vis da liberação da enzima do suporte em diferentes tempos de hidrólise.

Visto que a enzima foi liberada em 30 minutos de hidrólise, utilizou-se esse tempo de retirada da enzima para os testes consecutivos. Com o tempo de hidrólise devido, estudou o comportamento de um mesmo suporte após ser submetido a ciclos de imobilização e remoção do biocatalisador. Os resultados da atividade da lipase imobilizada em diferentes ciclos estão apresentados na Figura 4.32. Analisando os gráficos apresentados observa-se que na terceira imobilização ocorre uma melhora na atividade catalítica do biocatalisador imobilizado. Isso indica que nem todas as enzimas foram liberadas do suporte a partir do segundo ciclo de imobilização, já que a permanência do biocatalisador desnaturado aumenta o número de grupos funcionais na superfície do suporte¹⁹⁹. Liu e colaboradores¹⁹⁹, também observaram uma pequena melhora na atividade de lipases de *Candida Rugosa* após serem imobilizadas sobre enzimas desnaturadas na superfície do suporte. De acordo com os gráficos, a enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens* é capaz de manter a atividade mesmo quando imobilizada no suporte reutilizado nos 3 ciclos de imobilização avaliados.

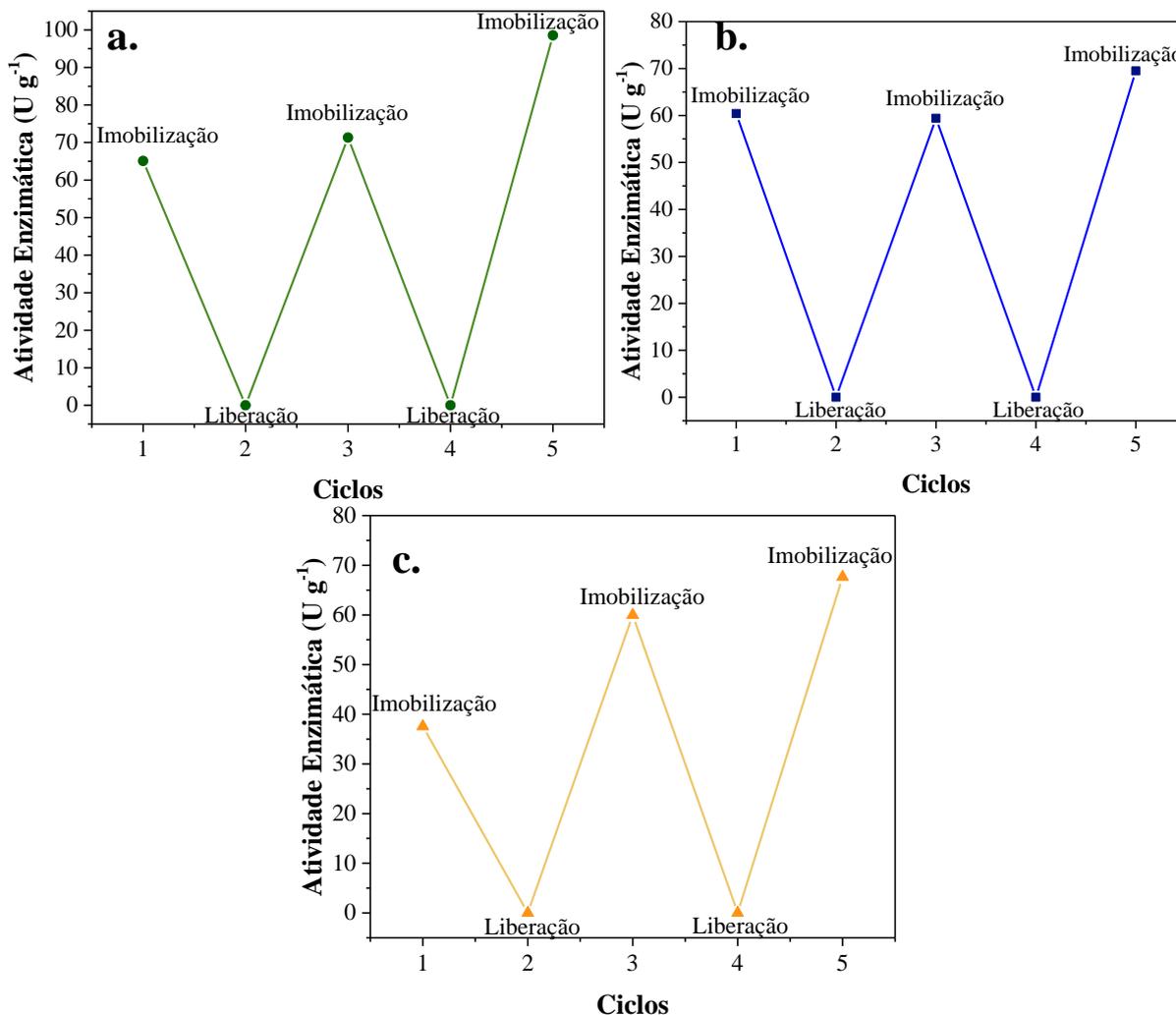


FIGURA 4. 32: Atividade enzimática por grama de suporte frente a hidrólise do óleo de oliva após ciclos consecutivos de remoção e imobilização para as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$.

Apesar de ser possível a reutilização do suporte, observou-se que com aumento dos ciclos de imobilização, as nanopartículas magnéticas eram separadas mais lentamente do meio reacional quando expostas ao campo magnético externo. Neste sentido, fez análise por FTIR das nanopartículas, afim de verificar se estava ocorrendo a oxidação das mesmas durante o reuso do suporte. Observa-se na FIGURA 4.33, que para todas as nanopartículas ocorreu o desaparecimento da banda referente ao $\text{Fe}^{2+}\text{-O}$ octaédricos em 385 cm^{-1} , indicando que o mesmo sofreu oxidação e o aparecimento de uma banda em 470 referente a maghemita, forma oxidada da magnetita⁹².

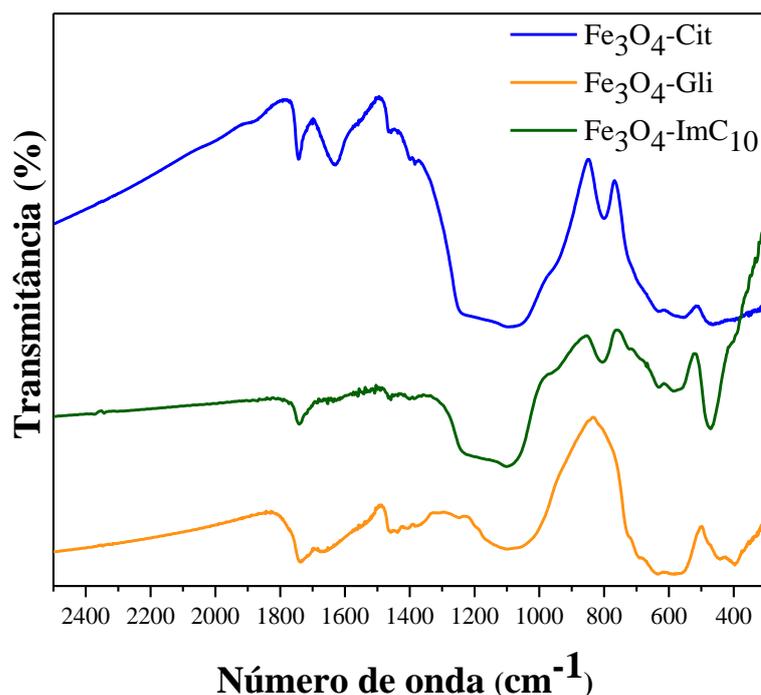


FIGURA 4. 33: Espectros de FTIR dos suportes ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$) após 3 ciclos de imobilização do biocatalisador.

4.1.13. Estudo do Efeito Plasmônico na Enzima Lipase de *Pseudomonas fluorescens*

Para o estudo da influência das nanopartículas de ouro na enzima lipase imobilizada, estudou-se diferentes estratégias de incorporação das do ouro nas enzimas imobilizadas no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, que apresentou melhores resultados de atividade hidrolítica. Primeiramente, fez-se o estudo para as nanopartículas de ouro esférica estabilizadas com citrato (AuNP). Previamente a utilização dessas nanopartículas esféricas, investigou-se o tamanho das nanopartículas sintetizadas, já que, em princípio, o tamanho das nanopartículas desloca o máximo de absorção para comprimentos de onda maiores devido ao efeito de ressonância plasmônica^{153,200}. No espectro de UV-Vis das nanopartículas, exibido na FIGURA 4.34, observa-se a presença de uma banda com máximo em ≈ 520 nm, indicando que as nanopartículas foram sintetizadas

com diâmetro de aproximadamente 18 nm¹⁵³. No estudo da influência das nanopartículas de ouro na atividade da enzima imobilizada utilizou-se então uma fonte de emissão de 510 nm.

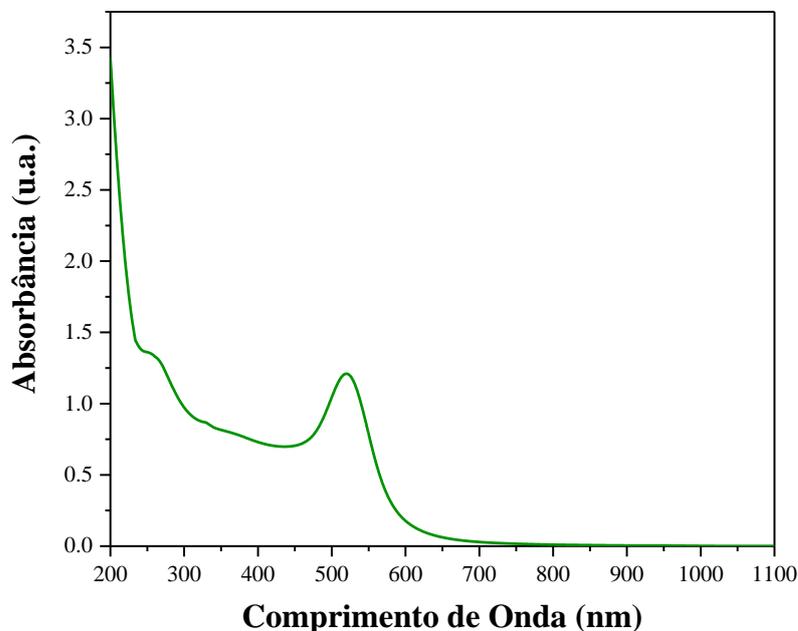


FIGURA 4. 34: Espectro de UV-Vis da solução de nanopartículas esféricas de ouro estabilizadas por citrato.

As estratégias avaliadas para incorporação das nanopartículas do ouro no biocatalisador estão esquematizados na FIGURA 4.35. A estratégia A foi o primeiro método estudado. Na FIGURA 4.36 observa-se a diminuição da atividade hidrolítica quando é adicionado quantidades mínimas de ouro (5 μ L). Este comportamento continua com o aumento da quantidade de ouro adicionado até que não há mais conversões detectadas.

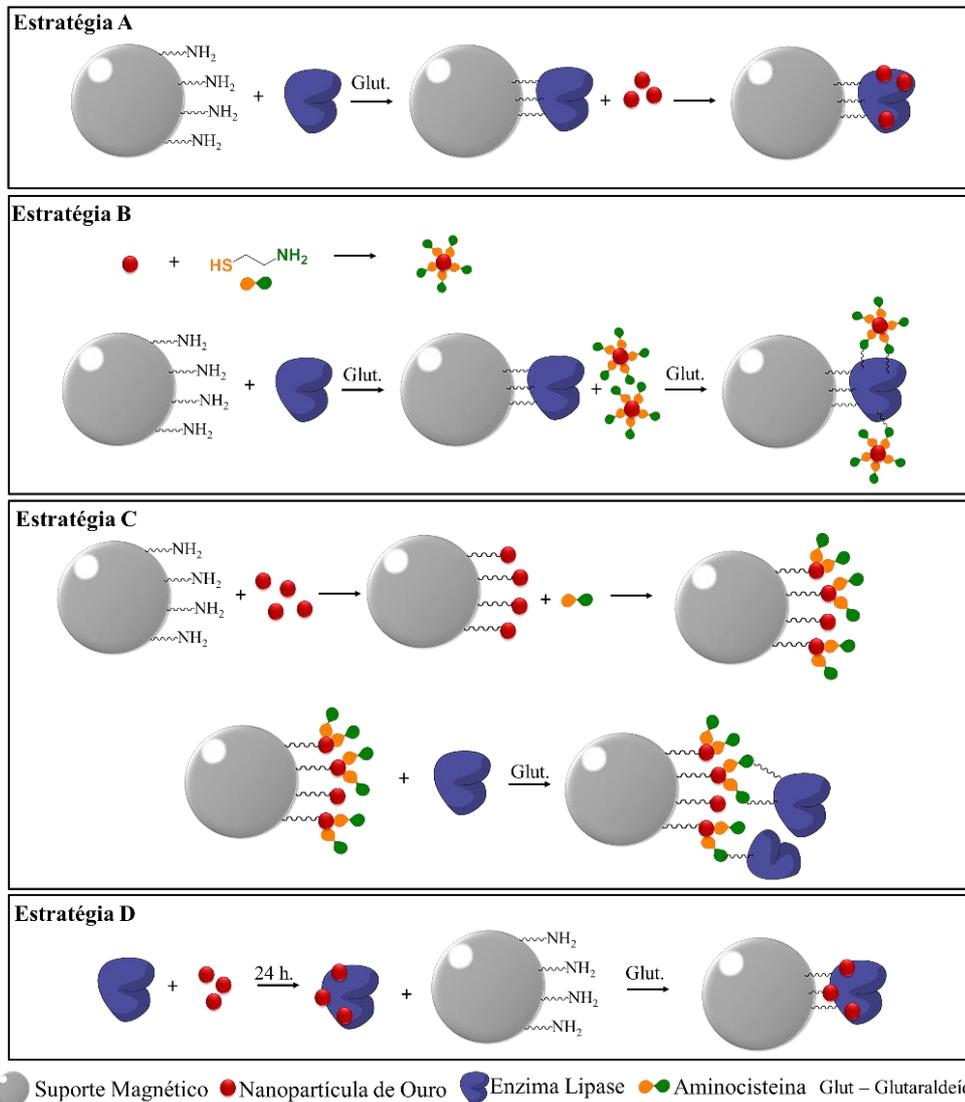


FIGURA 4. 35: Estratégias estudadas de incorporação do ouro ao bioconjugado.

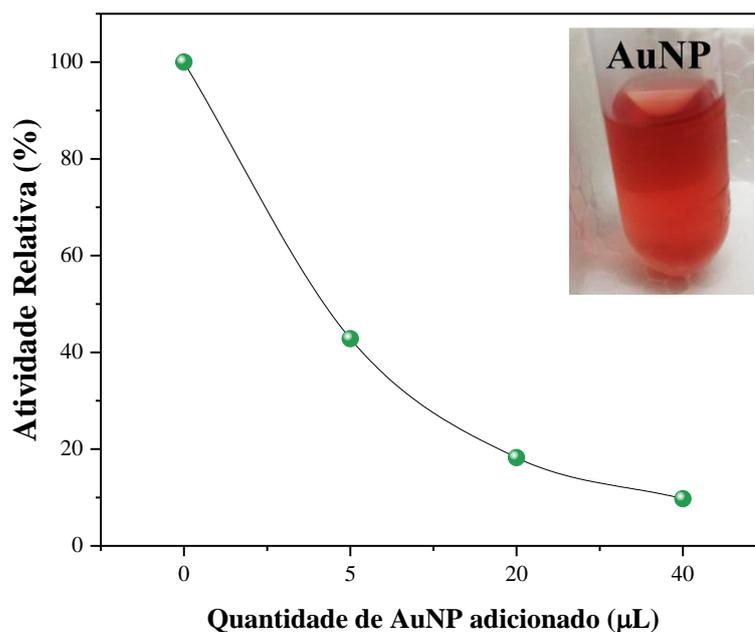


FIGURA 4. 36: Atividade hidrolítica relativa da enzima imobilizada com diferentes quantidades de ouro incorporado ao bioconjugado pela estratégia A.

Considerando que a estratégia A, baseia-se na tendência de interação do ouro por enxofre²⁰¹ e aminas²⁰², a diminuição da atividade pode estar associado ao fato da maior concentração de lisina estar presença na parte oposta da tampa para a enzima lipase de *Pseudomonas fluorescens*²⁰³, deste modo, possivelmente a imobilização ocorreu preferencialmente nesta região, deixando a região do sitio ativo/tampa exposto para a solução e ao adicionar o ouro após a imobilização ele se adere na região da tampa, aumento da rigidez e impedindo o acesso do substrato ao sítio catalítico²⁹. As demais estratégias, mesmo adicionando a menor quantidade de ouro não observou nenhuma conversão. Haja vista que o comportamento de diminuição da atividade foi observado para todos as estratégias de incorporação estudado, supõe-se que esse efeito pode estar relacionado com a carga superficial negativa da nanopartícula incorporada. Neste sentido foram sintetizados nanopartículas de ouro com carga superficial positiva utilizando CTAB como estabilizante.

O ouro com carga superficial catiônica foi sintetizado com morfologia de nanobastões (“nanorods”)^{6,134}. Na FIGURA 4.37 verifica-se duas

bandas de ressonância²⁰⁴, as bandas de absorção em aproximadamente 530 nm e 890 nm podem ser atribuídas a ressonância transversal e longitudinal dos nanobastões, respectivamente. Como não havia disponível uma fonte de led com comprimento de onda próximo a absorbância máxima dos nanobastões (≈ 890 nm) optou-se por utilizar a luz visível visto que há uma grande absorção nesta região do espectro (400-800 nm²⁰⁵).

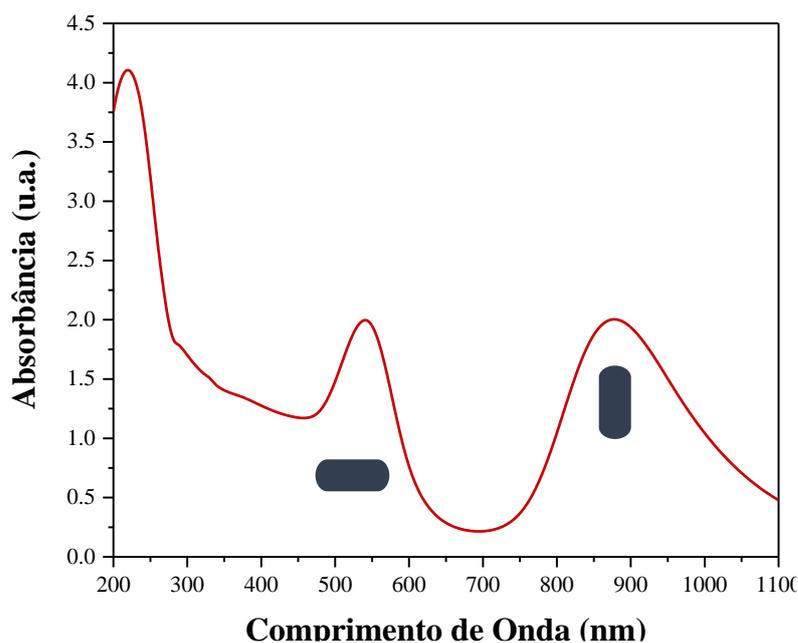


FIGURA 4. 37: Espectro de UV-Vis da solução de nanobastões de ouro estabilizadas por CTAB.

Assim como as nanopartículas esféricas, foram testadas diversas estratégias de incorporação dos nanobastões (AuNR) ao bioconjugado. De forma semelhante, observou-se baixos valores de conversão quando utilizando as estratégias A-C (TABELA 4.8). Na estratégia A a incorporação das nanobastões de ouro pode estar impedindo o acesso do substrato ao sítio catalítico de modo análogo as nanopartículas esféricas. Para as estratégias B e C, observou-se uma diminuição significativa na atividade utilizando 10 μ L da solução de nanobastões, devido à maior distância dos nanobastões de ouro da enzima. O aumento na distância das nanopartículas de ouro provoca a diminuição do efeito fototermal das nanopartículas^{206,207} sobre a enzima. Além disso, a adição consecutiva de

agente reticulante no biocatalizador imobilizado pode provocar o enrijecimento da tampa do sítio catalítico da lipase devido a formação de ligações intramoleculares^{186,208} na enzima já imobilizada, observando assim, a menor atividade relativa para estratégia B.

TABELA 4. 8: Atividade residual da enzima lipase imobilizada nas diferentes estratégias de incorporação de 10 μL da solução de AuNR. A atividade residual foi calculada em relação a atividade da enzima imobilizada quando não há nanopartículas de ouro no bioconjugado.

<i>Incorporação do AuNR</i>	<i>Atividade residual (%)</i>
<i>Estratégia A</i>	28
<i>Estratégia B</i>	15
<i>Estratégia C</i>	27

Adotando a estratégia D, no qual adiciona-se os nanobastões previamente a imobilização, observou-se uma melhora na atividade hidrolítica da enzima imobilizada (FIGURA 4.38). Na FIGURA 4.37 observa-se em todas as concentrações de AuNR obteve-se maiores atividades quando na presença de luz. Além disso, quando é utilizado 20 μL da solução de nanobastões verifica-se a maior atividade enzimática, atingindo 50% de melhora na atividade quando comparado com a enzima imobilizada sem a presença de nanobastões de ouro. Em relação a atividade da enzima imobilizada no escuro, observa-se uma melhora considerável na atividade (cerca de 4x) após a incidência de luz no sistema.

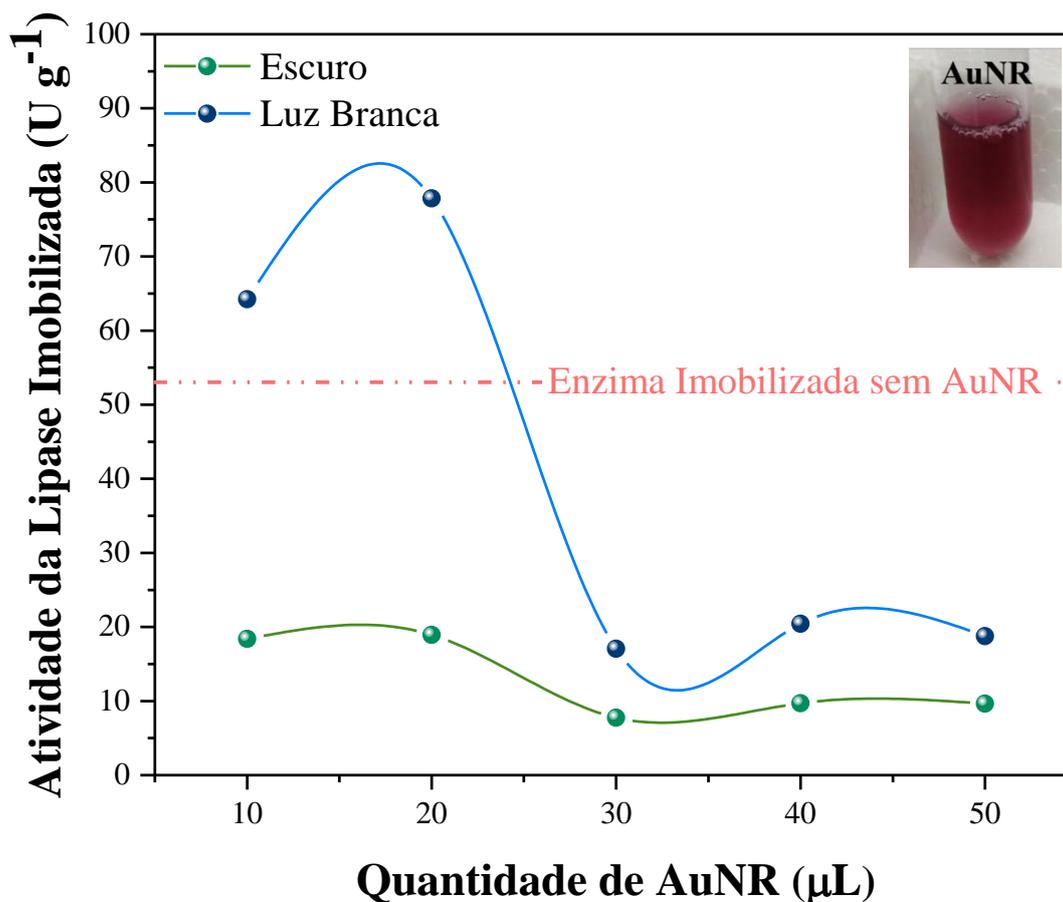


FIGURA 4. 38: Atividade hidrolítica da enzima imobilizada com diferentes quantidades de ouro (AuNR) por grama de suporte. Os nanobastões de ouro foram incorporados ao bioconjugado pela estratégia D.

Comparado aos demais métodos de incorporação do AuNR, a melhora na atividade utilizando a estratégia D, pode ser atribuído a incorporação do ouro previamente a imobilização. Uma vez que a imobilização pode acarretar no direcionamento das nanopartículas sobre o suporte^{209,210}, e considerando que o sítio ativo da enzima esteja exposto para a solução, ao adicionar as nanopartículas de ouro ocorre uma maior adsorção dessas nanopartículas na região mais exposta, ou seja próximo no sítio catalítico impedindo ou dificultando o acesso do substrato, principalmente no caso de substratos volumosos como os óleos vegetais.

Após a otimização da morfologia e método mais adequado de incorporar o ouro ao bioconjugado, a estratégia de adição do ouro foi avaliada frente ao suporte sintetizado com surfactante catiônico ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$) que também apresentou resultados promissores quando investigado a atividade hidrolítica da enzima imobilizada no mesmo (Seção 4.1.7). Na FIGURA 4.39 estão exibidas as atividades hidrolíticas por grama do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ no escuro e na presença de luz branca. Observa-se um comportamento semelhante ao suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, em que a maior atividade é obtida adicionando 20 μL de AuNR, porém, mesmo na presença de luz, menores atividades são observadas. Ao contrário do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$, no $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ não se observa uma melhora acentuada quando em presença de luz, de forma que a enzima na presença do ouro não atinge a atividade da enzima imobilizada sem AuNR.

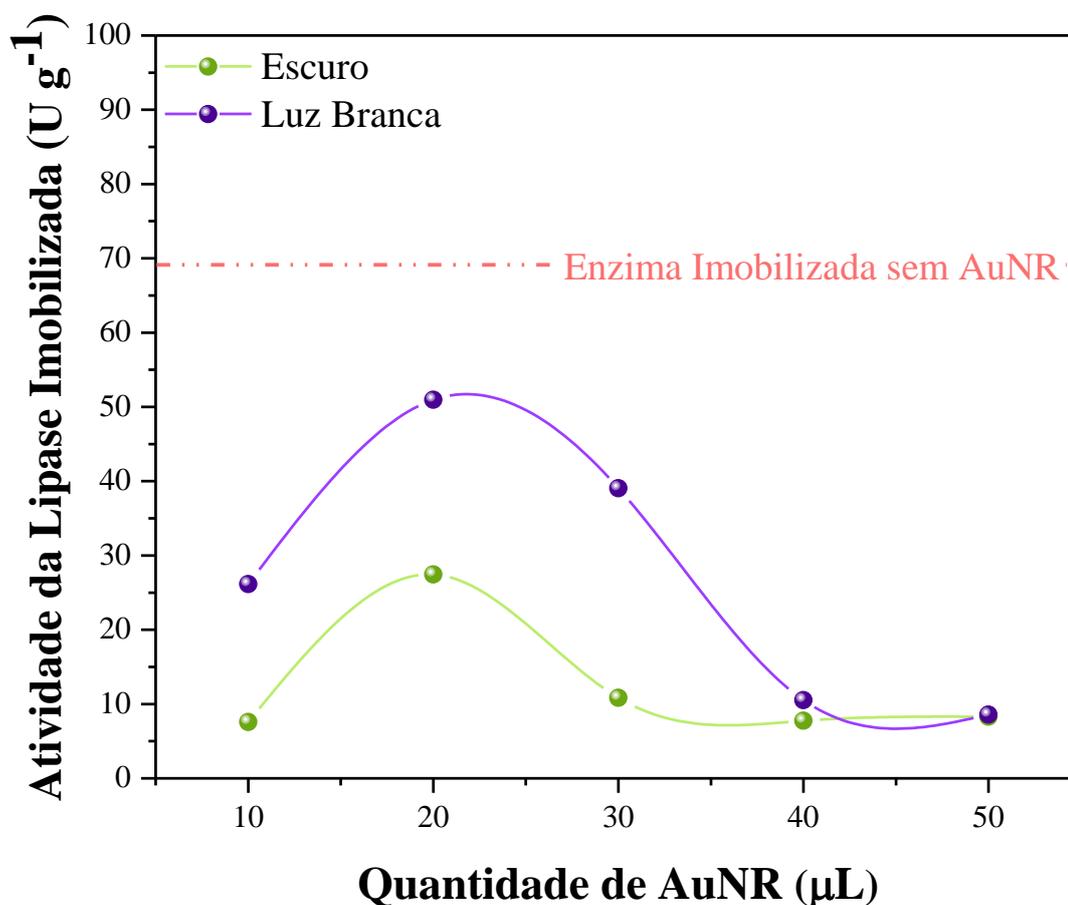


FIGURA 4. 39: Atividade hidrolítica da enzima imobilizada com diferentes quantidades de ouro (AuNR) por grama de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$.

Apesar da estratégia D não ser linear com os estudos de otimização dos parâmetros de imobilização, uma vez que adição do ouro previamente a imobilização provoca uma modificação do sistema otimizado na seção 4.1.5, os testes realizados com as diferentes estratégias de incorporação das nanopartículas de ouro podem servir como base de estudos futuros.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, pode se afirmar que foram sintetizadas nanopartículas de magnetita menores que 25 nanômetros. O método de recobrimento que se apresentou mais adequado foi o método bifase, no qual foi possível evitar a oxidação das nanopartículas durante o processo de recobrimento. A respeito da funcionalização com grupamentos NH_2 , as nanopartículas sintetizadas na presença do estabilizante imidazólio catiônico apresentaram maior funcionalização, que pode estar associado ao tipo de estabilizante utilizado.

Através do planejamento fatorial fracionário verificou-se que apenas o pH teve efeito considerável na imobilização da enzima lipase e melhores conversões foram obtidas utilizando 15 mg de nanopartícula no processo de imobilização. Nos cálculos quimiométricos também foi possível refinar as nanopartículas pra continuidade dos estudos, em que foram descartadas as nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-SC}_{10}$ pelos baixos valores de conversão (2,7%) e as nanopartículas funcionalizadas com $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-HPO}_3$, pela dificuldade na reprodutibilidade dos resultados. As nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ tiveram maiores valores de conversão quando imobilizadas em pH 5. Para estes três suportes, a nanopartícula de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ apresentou maior rendimentos de imobilização apesar da enzima imobilizada no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ apresentar maior conversão do óleo de soja a FAME. Melhora considerável na estabilidade térmica das enzimas foi observada quando imobilizadas nos suportes magnéticos em comparação às enzimas livres, na avaliação da reação de hidrólise do óleo de oliva.

A partir dos estudos das diferentes quantidades de substrato e do tipo do substrato acil receptor utilizado (etanol ou metanol), verificou-se que a utilização de 250 μL de óleo de soja e metanol e obteve-se melhores eficiências de conversões na reação de hidroesterificação do óleo de soja, atingindo a maior conversão (45%) a 45 °C em 24 horas de reação. Para a reação de hidrólise do

óleo de oliva foi possível reutilizar o suporte magnético por até 3 ciclos de imobilização da enzima lipase, visto que a reutilização destes em diversos ciclos pôde melhorar o processo de imobilização devido a presença de grupos funcionais residuais das enzimas imobilizadas previamente.

Através do estudo da incorporação do ouro ao bioconjugado verificou-se que a adição das nanopartículas de ouro (AuNP) resultou na diminuição da atividade hidrolítica da enzima imobilizada. A melhora na atividade hidrolítica da enzima foi verificado apenas para os nanobastões de ouro (AuNR), quando o ouro foi adicionado previamente a imobilização, atingindo aproximadamente 50% de melhora na atividade da enzima. Estudos ainda são necessários para compreender melhor a interação Au-Enzima quando submetido a ondas eletromagnéticas, porém os resultados demonstram que a incorporação do ouro no biocatalisador pode induzir a melhora na atividade enzimática quando submetido a ondas eletromagnéticas.

6. REFERÊNCIAS

1. Vogel A, May O. *Industrial Enzyme Applications*. (Vogel A, May O, eds.). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2019. doi:10.1002/9783527813780
2. Kirk O, Borchert TV, Fuglsang CC. Industrial enzyme applications. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):345-351. doi:10.1016/S0958-1669(02)00328-2
3. Singh R, Kumar M, Mittal A, Mehta PK. Microbial enzymes: industrial progress in 21st century. *3 Biotech*. 2016;6(2). doi:10.1007/s13205-016-0485-8
4. Chapman J, Ismail AE, Dinu CZ. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. *Catalysts*. 2018;8(6):20-29. doi:10.3390/catal8060238
5. Hughes G, Lewis JC. Introduction: Biocatalysis in Industry. *Chem Rev*. 2018;118(1):1-3. doi:10.1021/acs.chemrev.7b00741
6. Tadepalli S, Yim J, Madireddi K, Luan J, Naik RR, Singamaneni S. Gold Nanorod-Mediated Photothermal Enhancement of the Biocatalytic Activity of a Polymer-Encapsulated Enzyme. *Chem Mater*. 2017;29(15):6308-6314. doi:10.1021/acs.chemmater.7b01527
7. Schmid A, Hollmann F, Park JB, Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Curr Opin Biotechnol*. 2002;13(4):359-366. doi:10.1016/S0958-1669(02)00336-1
8. Guerrand D. Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. *OCL - Oilseeds fats, Crop Lipids*. 2017;24(4). doi:10.1051/ocl/2017031
9. Grunwald P. *Immobilized Biocatalysts*. Vol 1. (Grunwald P, ed.). MDPI; 2018. doi:10.3390/books978-3-03897-319-5
10. Robinson PK. Enzymes: principles and biotechnological applications. *Essays Biochem*. 2015;59:1-41. doi:10.1042/BSE0590001
11. Martínez Cuesta S, Rahman SA, Furnham N, Thornton JM. The Classification and Evolution of Enzyme Function. *Biophys J*. 2015;109(6):1082-1086. doi:10.1016/j.bpj.2015.04.020
12. Bommarius AS, Riebel-Bommarius BR. *Biocatalysis: Fundamentals and Applications*. Wiley-Blackwell; 2004.
13. Cooper G. The Cell: A Molecular Approach. In: Oxford University Press, ed. *The Cell: A Molecular Approach*. 8th ed. New York; 2019:816.

14. Abedi D, Zhang L, Pyne M, Perry Chou C. *Enzyme Biocatalysis*. Vol 1. (Illanes A, ed.). Dordrecht: Springer Netherlands; 2008. doi:10.1007/978-1-4020-8361-7
15. Johnson KA, Goody RS. The original Michaelis constant: Translation of the 1913 Michaelis-Menten Paper. *Biochemistry*. 2011;50(39):8264-8269. doi:10.1021/bi201284u
16. Cammack R. This is the IUBMB The Biochemical Nomenclature Committees. 2000:159-161.
17. Buchholz K, Kasche V, Bornscheuer UT. *Biocatalysts and Enzyme Technology*.; 2012.
18. Bharathi D, Rajalakshmi G, Komathi S. Optimization and production of lipase enzyme from bacterial strains isolated from petrol spilled soil. *J King Saud Univ - Sci*. 2018:10-13. doi:10.1016/j.jksus.2017.12.018
19. PATEL MT, NAGARAJAN R, KILARA A. Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: a review. *Chem Eng Commun*. 1996;152-153(1):365-404. doi:10.1080/00986449608936574
20. Canet A, Bonet-Ragel K, Benaiges MD, Valero F. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. *Biomass and Bioenergy*. 2016;85:94-99. doi:10.1016/j.biombioe.2015.11.021
21. Houde A, Kademi A, Leblanc D. Lipases and their industrial applications: An overview. *Appl Biochem Biotechnol - Part A Enzym Eng Biotechnol*. 2004;118(1-3):155-170. doi:10.1385/ABAB:118:1-3:155
22. Stergiou P, Foukis A, Filippou M, et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv*. 2013;31(8):1846-1859. doi:10.1016/j.biotechadv.2013.08.006
23. Netto CGCM, Andrade LH, Toma HE. Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron Asymmetry*. 2009;20(19):2299-2304. doi:10.1016/j.tetasy.2009.08.022
24. Dayton CLG. Enzymatic Interesterification. In: *Green Vegetable Oil Processing*. Elsevier; 2014:205-224. doi:10.1016/B978-0-9888565-3-0.50014-5
25. Cen Y, Singh W, Arkin M, et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. *Nat Commun*. 2019;10(1). doi:10.1038/s41467-019-11155-3
26. Alberghina L, Schmid R, Verger R. *Lipases: Structure, Mechanism and Genetic Engineering*. Vol 16. (VCH, ed.); 1991.

27. Zisis T, Freddolino PL, Turunen P, Van Teeseling MCF, Rowan AE, Blank KG. Interfacial Activation of *Candida antarctica* Lipase B: Combined Evidence from Experiment and Simulation. *Biochemistry*. 2015;54(38):5969-5979. doi:10.1021/acs.biochem.5b00586
28. Cheng M, Angkawidjaja C, Koga Y, Kanaya S. Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I.3 lipase with unique two lid structures. *FEBS J*. 2012;279(19):3727-3737. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08734.x
29. Khan FI, Lan D, Durrani R, Huan W, Zhao Z, Wang Y. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. *Front Bioeng Biotechnol*. 2017;5(MAR):1-13. doi:10.3389/fbioe.2017.00016
30. Palomo JM, Fernández-Lorente G, Ortiz C, et al. Conformational engineering of lipases via directed immobilisation: Improving the resolution of chiral drugs. *Med Chem Rev - Online*. 2005;2(5):369-378. doi:10.2174/156720305774330494
31. Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: An overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64(6):763-781. doi:10.1007/s00253-004-1568-8
32. Anobom CD, Pinheiro AS, De-Andrade RA, et al. From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. *Biomed Res Int*. 2014;2014. doi:10.1155/2014/684506
33. Rios NS, Pinheiro BB, Pinheiro MP, Bezerra RM, dos Santos JCS, Barros Gonçalves LR. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process Biochem*. 2018;75:99-120. doi:10.1016/j.procbio.2018.09.003
34. Bernal C, Guzman F, Illanes A, Wilson L. Selective and eco-friendly synthesis of lipoaminoacid-based surfactants for food, using immobilized lipase and protease biocatalysts. *Food Chem*. 2018;239:189-195. doi:10.1016/j.foodchem.2017.06.105
35. De Godoy Daiha K, Angeli R, De Oliveira SD, Almeida RV. Are lipases still important biocatalysts? A study of scientific publications and patents for technological forecasting. *PLoS One*. 2015;10(6):1-20. doi:10.1371/journal.pone.0131624
36. Karim Z, Afrin S, Husain Q, Danish R. Necessity of enzymatic hydrolysis for production and functionalization of nanocelluloses. *Crit Rev Biotechnol*. 2017;37(3):355-370. doi:10.3109/07388551.2016.1163322
37. Ramnath L, Sithole B, Govinden R. Classification of lipolytic enzymes and their biotechnological applications in the pulping industry. *Can J Microbiol*. 2017;63(3):179-192. doi:10.1139/cjm-2016-0447

38. Horchani H, Aissa I, Ouertani S, Zarai Z, Gargouri Y, Sayari A. Staphylococcal lipases: Biotechnological applications. *J Mol Catal B Enzym.* 2012;76:125-132. doi:10.1016/j.molcatb.2011.11.018
39. Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases. *Enzyme Microb Technol.* 2006;39(2):235-251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016
40. Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. *Adsorption.* 2014;20(5-6):801-821. doi:10.1007/s10450-014-9623-y
41. Grunwald P. Immobilized biocatalysts. *Catalysts.* 2018;8(9). doi:10.3390/catal8090386
42. Netto CGCM, Toma HE, Andrade LH. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *J Mol Catal B Enzym.* 2013;85-86:71-92. doi:10.1016/j.molcatb.2012.08.010
43. Resende RR, Souza LT de A, Veríssimo LAA, et al. *Imobilização Enzimática: Princípios Fundamentais e Tipos de Suporte.*; 2017. doi:10.5151/9788521211150-15
44. Dale JK, Langlois DP. SIRUP AND METHOD OF MAKING THE SAME. 1940.
45. Dunnill P. Immobilized enzymes — research and development. *Biochem Educ.* 1979;7(3):73. doi:10.1016/0307-4412(79)90055-4
46. Datta S, Christena LR, Rajaram YRS. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech.* 2013;3(1):1-9. doi:10.1007/s13205-012-0071-7
47. Zucca P, Sanjust E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules.* 2014;19(9):14139-14194. doi:10.3390/molecules190914139
48. Vaghari H, Jafarizadeh-Malmiri H, Mohammadlou M, et al. Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. *Biotechnol Lett.* 2016;38(2):223-233. doi:10.1007/s10529-015-1977-z
49. Brena B, González-Pombo P, Batista-Viera F. Immobilization of enzymes: A literature survey. *Methods Mol Biol.* 2013;1051:15-31. doi:10.1007/978-1-62703-550-7_2
50. Sheldon RA, van Pelt S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6223-6235. doi:10.1039/c3cs60075k
51. Silva C, Martins M, Jing S, Fu J, Cavaco-Paulo A. Practical insights on

- enzyme stabilization. *Crit Rev Biotechnol*. 2018;38(3):335-350.
doi:10.1080/07388551.2017.1355294
52. Zhang B, Weng Y, Xu H, Mao Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(1):61-70.
doi:10.1007/s00253-011-3672-x
53. Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: An update. *J Chem Biol*. 2013;6(4):185-205. doi:10.1007/s12154-013-0102-9
54. Meryam Sardar RA. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. *Biochem Anal Biochem*. 2015;04(02). doi:10.4172/2161-1009.1000178
55. Carvalho F, Paradiso P, Saramago B, Ferraria AM, Do Rego AMB, Fernandes P. An integrated approach for the detailed characterization of an immobilized enzyme. *J Mol Catal B Enzym*. 2016;125:64-74.
doi:10.1016/j.molcatb.2016.01.001
56. Sastre DE, Reis EA, Marques Netto CGC. Strategies to rationalize enzyme immobilization procedures. *Methods Enzymol*. 2019:1-30.
doi:10.1016/bs.mie.2019.09.003
57. Sobral KA, Rodrigues RO, Oliveira RD, Olivo JE, De Moraes FF, Zanin GM. Evaluation of Supports and Methods for Immobilization of Enzyme Cyclodextringlycosyltransferase. *Appl Biochem Biotechnol*. 2003;108(1-3):809-820. doi:10.1385/ABAB:108:1-3:809
58. Chang SW, Shaw JF, Yang KH, Chang SF, Shieh CJ. Studies of optimum conditions for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase on poly(γ -glutamic acid) by RSM. *Bioresour Technol*. 2008;99(8):2800-2805.
doi:10.1016/j.biortech.2007.06.020
59. Bezerra MA, Santelli RE, Oliveira EP, Villar LS, Escalera LA. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*. 2008;76(5):965-977.
doi:10.1016/j.talanta.2008.05.019
60. Jun LY, Mubarak NM, Yon LS, et al. Immobilization of Peroxidase on Functionalized MWCNTs-Buckypaper/Polyvinyl alcohol Nanocomposite Membrane. *Sci Rep*. 2019;9(1):1-15. doi:10.1038/s41598-019-39621-4
61. Lavine BK, Workman J. Chemometrics. *Anal Chem*. 2013;85(2):705-714.
doi:10.1021/ac303193j
62. Sheldon RA. Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Adv Synth Catal*. 2007;349(8-9):1289-1307.
doi:10.1002/adsc.200700082

63. Siffer F, Ponche A, Fioux P, Schultz J, Roucoules V. A chemometric investigation of the effect of the process parameters during maleic anhydride pulsed plasma polymerization. *Anal Chim Acta*. 2005;539(1-2):289-299. doi:10.1016/j.aca.2005.02.072
64. Brereton RG. The evolution of chemometrics. *Anal Methods*. 2013;5(16):3785-3789. doi:10.1039/c3ay90051g
65. Bruns RE, Scarminio IS, Neto B de B. *Statistical Design – Chemometrics*. Elsevier Science; 2005.
66. Teófilo RF. Quimiometria II - Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais. 2006;29(2):338-350.
67. Irfan M, Ghazanfar M, Ur Rehman A, Siddique A. Strategies to Reuse Cellulase: Immobilization of Enzymes (Part II). 2019;(Part II):137-151. doi:10.1007/978-3-030-14726-6_9
68. Zdarta J, Meyer AS, Jesionowski T, Pinelo M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. *Catalysts*. 2018;8(2):92. doi:10.3390/catal8020092
69. Sigurdardóttir SB, Lehmann J, Ovtar S, et al. Enzyme Immobilization on Inorganic Surfaces for Membrane Reactor Applications: Mass Transfer Challenges, Enzyme Leakage and Reuse of Materials. *Adv Synth Catal*. 2018;360(14):2578-2607. doi:10.1002/adsc.201800307
70. Urrutia P, Arrieta R, Alvarez L, Cardenas C, Mesa M, Wilson L. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. *Int J Biol Macromol*. 2018;108:674-686. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.12.062
71. Huang WC, Wang W, Xue C, et al. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. *Crit Rev Biotechnol*. 2019;39(2):8118-8124. doi:10.1080/07388551.2018.1531822
72. Huang WC, Wang W, Xue C, Mao X. Effective Enzyme Immobilization onto a Magnetic Chitin Nanofiber Composite. *ACS Sustain Chem Eng*. 2018;6(7):8118-8124. doi:10.1021/acssuschemeng.8b01150
73. Singh V, Srivastava P, Singh A, Singh D, Malviya T. Polysaccharide-silica hybrids: Design and applications. *Polym Rev*. 2016;56(1):113-136. doi:10.1080/15583724.2015.1090449
74. Jiang Y, Guo C, Xia H, Mahmood I, Liu C, Liu H. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. *J Mol Catal B Enzym*. 2009;58(1-4):103-109.

- doi:10.1016/j.molcatb.2008.12.001
75. Johnson AK, Zawadzka AM, Deobald LA, Crawford RL, Paszczynski AJ. Novel method for immobilization of enzymes to magnetic nanoparticles. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(6):1009-1025. doi:10.1007/s11051-007-9332-5
 76. Akbarzadeh A, Samiei M, Davaran S. Magnetic nanoparticles: Preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7:1-13. doi:10.1186/1556-276X-7-144
 77. Morrish AH. *The Physical Principles of Magnetism.*; 2001. doi:10.1109/9780470546581
 78. Liao MH, Chen DH. Immobilization of yeast alcohol dehydrogenase on magnetic nanoparticles for improving its stability. *Biotechnol Lett.* 2001;23(20):1723-1727. doi:10.1023/A:1012485221802
 79. Xu J, Sun J, Wang Y, Sheng J, Wang F, Sun M. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. *Molecules.* 2014;19(8):11465-11486. doi:10.3390/molecules190811465
 80. Govan J, Gun'ko Y. Recent Advances in the Application of Magnetic Nanoparticles as a Support for Homogeneous Catalysts. *Nanomaterials.* 2014;4(2):222-241. doi:10.3390/nano4020222
 81. Mameli V, Musinu A, Ardu A, et al. Studying the effect of Zn-substitution on the magnetic and hyperthermic properties of cobalt ferrite nanoparticles. *Nanoscale.* 2016;8(19):10124-10137. doi:10.1039/c6nr01303a
 82. Folgado E, Guerre M, Mimouni N, et al. π -Stacking Interactions of Graphene-Coated Cobalt Magnetic Nanoparticles with Pyrene-Tagged Dendritic Poly(Vinylidene Fluoride). *Chempluschem.* 2019;84(1):78-84. doi:10.1002/cplu.201800471
 83. Wu N, Liu X, Zhao C, Cui C, Xia A. Effects of particle size on the magnetic and microwave absorption properties of carbon-coated nickel nanocapsules. *J Alloys Compd.* 2016;656:628-634. doi:10.1016/j.jallcom.2015.10.027
 84. Science OF. Patent Application Publication. Pub . No .: US 2016 / 0271610 A1 Patent Application Publication. 2016;1(19):1-5.
 85. Chen S, Lee SL, André P. Silicide induced surface defects in FePt nanoparticle fcc-to-fct thermally activated phase transition. *J Magn Magn Mater.* 2016;417:442-450. doi:10.1016/j.jmmm.2016.05.099
 86. Silva AR da, Souza Junior IG de, Costa ACS da. Suscetibilidade magnética do horizonte B de solos do Estado do Paraná. *Rev Bras Ciência do Solo.* 2010;34(2):329-338. doi:10.1590/S0100-06832010000200006

87. Cordova G, Attwood S, Gaikwad R, Gu F, Leonenko Z. Nano Biomed Eng Magnetic Force Microscopy Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. *Nano Biomed Eng.* 2014;6(1):31-39. doi:10.5101/nbe.v6i1.p31-39.Magnetic
88. Sakulkhu U, Mahmoudi M, Maurizi L, et al. Significance of surface charge and shell material of superparamagnetic iron oxide nanoparticle (SPION) based core/shell nanoparticles on the composition of the protein corona. *Biomater Sci.* 2015;3(2):265-278. doi:10.1039/c4bm00264d
89. Xu C, Sun S. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2013;65(5):732-743. doi:10.1016/j.addr.2012.10.008
90. Clemons TD, Kerr RH, Joos A. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis, and Biomedical Applications. *Compr Nanosci Nanotechnol.* 2019:193-210. doi:10.1016/b978-0-12-803581-8.10462-x
91. Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, Von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Magn Mater.* 2005;293(1):483-496. doi:10.1016/j.jmmm.2005.01.064
92. Cornell RM, Schwertmann U. *Introduction to the Iron Oxides.* doi:10.1002/3527602097.ch1
93. Sun S, Zeng H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *J Am Chem Soc.* 2002;124(28):8204-8205. doi:10.1021/ja026501x
94. Nedkov I, Slavov L, Merodiiska T, et al. Size effects in monodomain magnetite based ferrofluids. *J Nanoparticle Res.* 2008;10(5):877-880. doi:10.1007/s11051-007-9311-x
95. Kozlenko DP, Dubrovinsky LS, Kichanov SE, et al. Magnetic and electronic properties of magnetite across the high pressure anomaly. *Sci Rep.* 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-41184-3
96. Phan MH, Alonso J, Khurshid H, et al. Exchange bias effects in iron oxide-based nanoparticle systems. *Nanomaterials.* 2016;6(11). doi:10.3390/nano6110221
97. Hiemstra T. Surface structure controlling nanoparticle behavior: Magnetism of ferrihydrite, magnetite, and maghemite. *Environ Sci Nano.* 2018;5(3):752-764. doi:10.1039/c7en01060e
98. Jensen KMØ, Andersen HL, Tyrsted C, et al. Mechanisms for iron oxide formation under hydrothermal conditions: An in situ total scattering study. *ACS Nano.* 2014;8(10):10704-10714. doi:10.1021/nn5044096
99. Shmakov AN, Kryukova GN, Tsybulya S V., Chuvilin AL, Solovyeva LP.

- Vacancy Ordering in γ -Fe₂O₃ : Synchrotron X-ray Powder Diffraction and High-Resolution Electron Microscopy Studies . *J Appl Crystallogr.* 1995;28(2):141-145. doi:10.1107/s0021889894010113
100. Longo E, de Almeida La Porta F. Recent advances in complex functional materials: From design to application. *Recent Adv Complex Funct Mater From Des to Appl.* 2017:1-454. doi:10.1007/978-3-319-53898-3
 101. Li Q, Kartikowati CW, Horie S, Ogi T, Iwaki T, Okuyama K. Correlation between particle size/domain structure and magnetic properties of highly crystalline Fe₃O₄ nanoparticles. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-4. doi:10.1038/s41598-017-09897-5
 102. Chee CF, Leo BF, Lai CW. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery. In: *Applications of Nanocomposite Materials in Drug Delivery.* Elsevier; 2018:861-903. doi:10.1016/B978-0-12-813741-3.00038-8
 103. Butler RF, Banerjee SK. Theoretical single-domain grain size range in magnetite and titanomagnetite. *J Geophys Res.* 1975;80(29):4049-4058. doi:10.1029/jb080i029p04049
 104. Leslie-Pelecky DL, Rieke RD. Magnetic properties of nanostructured materials. *Chem Mater.* 1996;8(8):1770-1783. doi:10.1021/cm960077f
 105. Franco V, Conde CF, Conde A, Kiss LF. Relationship between coercivity and magnetic moment of superparamagnetic particles with dipolar interaction. *Phys Rev B - Condens Matter Mater Phys.* 2005;72(17):1-10. doi:10.1103/PhysRevB.72.174424
 106. Kumar D, Narayan J, Kvit A V., Sharma AK, Sankar J. High coercivity and superparamagnetic behavior of nanocrystalline iron particles in alumina matrix. *J Magn Magn Mater.* 2001;232(3):161-167. doi:10.1016/S0304-8853(01)00191-3
 107. Guimarães AP. *Principles of Nanomagnetism.*; 2009. doi:10.1007/978-3-642-01482-6
 108. Marghussian V. Magnetic Properties of Nano-Glass Ceramics. In: *Nano-Glass Ceramics.* Elsevier; 2015:181-223. doi:10.1016/B978-0-323-35386-1.00004-9
 109. Kandasamy G, Maity D. Recent advances in superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) for in vitro and in vivo cancer nanotheranostics. *Int J Pharm.* 2015;496(2):191-218. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.10.058
 110. Manojkumar K, Sivaramakrishna A, Vijayakrishna K. A short review on stable metal nanoparticles using ionic liquids, supported ionic liquids, and poly(ionic liquids). *J Nanoparticle Res.* 2016;18(4). doi:10.1007/s11051-

016-3409-y

111. Kolhatkar AG, Jamison AC, Litvinov D, Willson RC, Lee TR. *Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles*. Vol 14.; 2013. doi:10.3390/ijms140815977
112. Arruebo M, Fernández-pacheco R, Ibarra MR, Santamaría J. Magnetic nanoparticles Controlled release of drugs from nanostructured functional materials. *Rev Lit Arts Am*. 2007;2(3):22-32. doi:10.1016/S1748-0132(07)70084-1
113. Katz E, Willner I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: Synthesis, properties, and applications. *Angew Chemie - Int Ed*. 2004;43(45):6042-6108. doi:10.1002/anie.200400651
114. Baron R, Willner B, Willner I. Biomolecule-nanoparticle hybrids as functional units for nanobiotechnology. *Chem Commun*. 2007;(4):323-332. doi:10.1039/b610721b
115. Gul S, Khan SB, Rehman IU, Khan MA, Khan MI. A Comprehensive Review of Magnetic Nanomaterials Modern Day Theranostics. *Front Mater*. 2019;6(July):1-15. doi:10.3389/fmats.2019.00179
116. Sabale S, Kandesar P, Jadhav V, Komorek R, Motkuri RK, Yu XY. Recent developments in the synthesis, properties, and biomedical applications of core/shell superparamagnetic iron oxide nanoparticles with gold. *Biomater Sci*. 2017;5(11):2212-2225. doi:10.1039/c7bm00723j
117. Sodipo BK, Aziz AA. Recent advances in synthesis and surface modification of superparamagnetic iron oxide nanoparticles with silica. *J Magn Magn Mater*. 2016;416(1-4):275-291. doi:10.1016/j.jmmm.2016.05.019
118. Kaur R, Hasan A, Iqbal N, Alam S, Saini MK, Raza SK. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: A review. *J Sep Sci*. 2014;37(14):1805-1825. doi:10.1002/jssc.201400256
119. Yadollahpour A. Magnetic nanoparticles in medicine: A review of synthesis methods and important characteristics. *Orient J Chem*. 2015;31:271-277. doi:10.13005/ojc/31.Special-Issue1.33
120. Ji J, Huang Y, Yin J, et al. Electromagnetic Wave Absorption Performance on Fe₃O₄ Polycrystalline Synthesized by the Synergy Reduction of Ethylene Glycol and Diethylene Glycol. *J Phys Chem C*. 2018;122(6):3628-3637. doi:10.1021/acs.jpcc.7b11533
121. Jamshidiyan M, Shirani AS, Alahyarizadeh G. Solvothermal synthesis and characterization of magnetic Fe₃O₄ nanoparticle by different sodium salt

- sources. *Mater Sci Pol.* 2017;35(1):50-57. doi:10.1515/msp-2017-0004
122. Chastellain M, Petri A, Hofmann H. Particle size investigations of a multistep synthesis of PVA coated superparamagnetic nanoparticles. *J Colloid Interface Sci.* 2004;278(2):353-360. doi:10.1016/j.jcis.2004.06.025
 123. Schaming D, Remita H. Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. *Found Chem.* 2015;17(3):187-205. doi:10.1007/s10698-015-9235-y
 124. Chen YT, Lee PH, Shen PT, et al. Study of Nonlinear Plasmonic Scattering in Metallic Nanoparticles. *ACS Photonics.* 2016;3(8):1432-1439. doi:10.1021/acsp Photonics.6b00025
 125. Freestone I, Meeks N, Sax M, Higgitt C. The Lycurgus Cup — A Roman nanotechnology. *Gold Bull.* 2007;40(4):270-277. doi:10.1007/BF03215599
 126. Mulvaney P. Nanoscience vs nanotechnology-defining the field. *ACS Nano.* 2015;9(3):2215-2217. doi:10.1021/acsnano.5b01418
 127. Wilson R. The use of gold nanoparticles in diagnostics and detection. *Chem Soc Rev.* 2008;37(9):2028-2045. doi:10.1039/b712179m
 128. Olson J, Dominguez-Medina S, Hoggard A, Wang LY, Chang WS, Link S. Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. *Chem Soc Rev.* 2015;44(1):40-57. doi:10.1039/c4cs00131a
 129. Jana J, Ganguly M, Pal T. Enlightening surface plasmon resonance effect of metal nanoparticles for practical spectroscopic application. *RSC Adv.* 2016;6(89):86174-86211. doi:10.1039/c6ra14173k
 130. Verma P, Kuwahara Y, Mori K, Yamashita H. Design of silver-based controlled nanostructures for plasmonic catalysis under visible light irradiation. *Bull Chem Soc Jpn.* 2019;92(1):19-29. doi:10.1246/bcsj.20180244
 131. Eustis S, El-Sayed MA. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem Soc Rev.* 2006;35(3):209-217. doi:10.1039/b514191e
 132. Eng NB, Abel B, Akinsule A, Andrews C, Aslan K. Article Nano Biomed Eng Plasmon-Enhanced Enzymatic Reactions 2 : Optimization of Enzyme Activity by Surface Modification of Silver Island Films. (strategy 3):23-28. doi:10.5101/nbe.v4i1.p23-28.1.
 133. Kim SM, Lee SW, Moon SY, Park JY. The effect of hot electrons and surface plasmons on heterogeneous catalysis. *J Phys Condens Matter.*

- 2016;28(25). doi:10.1088/0953-8984/28/25/254002
134. Tadepalli S, Yim J, Cao S, Wang Z, Naik RR, Singamaneni S. Metal–Organic Framework Encapsulation for the Preservation and Photothermal Enhancement of Enzyme Activity. *Small*. 2018;14(7):1-8. doi:10.1002/sml.201702382
 135. Li W, Liu D, Geng X, Li Z, Gao R. Real-time regulation of catalysis by remote-controlled enzyme-conjugated gold nanorod composites for aldol reaction-based applications. *Catal Sci Technol*. 2019;9(9):2221-2230. doi:10.1039/c9cy00167k
 136. Alex S, Tiwari A. Functionalized gold nanoparticles: Synthesis, properties and applications-A review. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015;15(3):1869-1894. doi:10.1166/jnn.2015.9718
 137. Stanicki D, Elst L Vander, Muller RN, Laurent S. Synthesis and processing of magnetic nanoparticles. *Curr Opin Chem Eng*. 2015;8:7-14. doi:10.1016/j.coche.2015.01.003
 138. Vanyúr R, Biczók L, Miskolczy Z. Micelle formation of 1-alkyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquids in aqueous solution. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2007;299(1-3):256-261. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.11.049
 139. Al-Johani H, Abou-Hamad E, Jedidi A, et al. The structure and binding mode of citrate in the stabilization of gold nanoparticles. *Nat Chem*. 2017;9(9):890-895. doi:10.1038/nchem.2752
 140. Chen F, Xie S, Huang X, Qiu X. Ionothermal synthesis of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles as efficient heterogeneous Fenton-like catalysts for degradation of organic pollutants with H₂O₂. *J Hazard Mater*. 2017;322:152-162. doi:10.1016/j.jhazmat.2016.02.073
 141. Modenez IA, Sastre DE, Moares FC, Marques Netto CGC. Influence of dlutaraldehyde cross-linking modes on the recyclability of immobilized lipase b from candida antarctica for transesterification of soy bean oil. *Molecules*. 2018;23(9). doi:10.3390/molecules23092230
 142. Luo Y, Yang J, Yan Y, et al. RGD-functionalized ultrasmall iron oxide nanoparticles for targeted T₁-weighted MR imaging of gliomas. *Nanoscale*. 2015;7(34):14538-14546. doi:10.1039/C5NR04003E
 143. Ta TKH, Trinh MT, Long NV, et al. Synthesis and surface functionalization of Fe₃O₄-SiO₂ core-shell nanoparticles with 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane and 1,1'-carbonyldiimidazole for bio-applications. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2016;504:376-383. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.05.008

144. Zou J, Peng YG, Tang YY. A facile bi-phase synthesis of Fe₃O₄@SiO₂ core-shell nanoparticles with tunable film thicknesses. *RSC Adv.* 2014;4(19):9693-9700. doi:10.1039/c3ra47043a
145. Netto CGCM, Nakamatsu EH, Netto LES, et al. Catalytic properties of thioredoxin immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *J Inorg Biochem.* 2011;105(5):738-744. doi:10.1016/j.jinorgbio.2011.02.006
146. Bruce IJ, Sen T. Surface modification of magnetic nanoparticles with alkoxysilanes and their application in magnetic bioseparations. *Langmuir.* 2005;21(15):7029-7035. doi:10.1021/la050553t
147. Sigma Aldrich. Enzymatic Assay of LIPASE (EC 3.1.1.3) (Olive Oil as Substrate). 1999:29-31.
148. Lowry RR, Tinsley IJ. Rapid colorimetric determination of free fatty acids. *J Am Oil Chem Soc.* 1976;53(7):470-472. doi:10.1007/BF02636814
149. Carvalho NB, Barbosa JMP, Oliveira MVS, Fricks AT, Lima AS, Soares CMF. Biochemical properties of Bacillus sp. ITP-001 lipase immobilized with a sol gel process. *Quim Nova.* 2013;36(1):52-58. doi:10.1590/S0100-40422013000100010
150. Kareem SO, Adio OQ, Osho MB. Immobilization of Aspergillus niger F7-02 lipase in polysaccharide hydrogel beads of Irvingia gabonensis matrix. *Enzyme Res.* 2014;2014. doi:10.1155/2014/967056
151. Ebrahimpour A, Rahman RNZRA, Kamarudin NHA, Basri M, Salleh AB. Lipase production and growth modeling of a novel thermophilic bacterium: Aneurinibacillus thermoaerophilus strain AFNA. *Electron J Biotechnol.* 2011;14(4):6. doi:10.2225/vol14-issue4-fulltext-8
152. Khoramnia A, Ebrahimpour A, Ghanbari R, Ajdari Z, Lai OM. Improvement of medium chain fatty acid content and antimicrobial activity of coconut oil via solid-state fermentation using a malaysian geotrichum candidum. *Biomed Res Int.* 2013;2013(May). doi:10.1155/2013/954542
153. Bastús NG, Comenge J, Puentes V. Kinetically controlled seeded growth synthesis of citrate-stabilized gold nanoparticles of up to 200 nm: Size focusing versus ostwald ripening. *Langmuir.* 2011;27(17):11098-11105. doi:10.1021/la201938u
154. Liu G, Wang S, Yang X, et al. Colorimetric sensing of atrazine in rice samples using cysteamine functionalized gold nanoparticles after solid phase extraction. *Anal Methods.* 2016;8(1):52-56. doi:10.1039/c5ay02810h
155. Liu S, Xing R, Lu F, Rana RK, Zhu JJ. One-pot template-free fabrication

- of hollow magnetite nanospheres and their application as potential drug carries. *J Phys Chem C*. 2009;113(50):21042-21047. doi:10.1021/jp907296n
156. Fan T, Pan D, Zhang H. Study on formation mechanism by monitoring the morphology and structure evolution of nearly monodispersed Fe₃O₄ submicroparticles with controlled particle sizes. *Ind Eng Chem Res*. 2011;50(15):9009-9018. doi:10.1021/ie200970j
 157. Li S, Zhang T, Tang R, Qiu H, Wang C, Zhou Z. Solvothermal synthesis and characterization of monodisperse superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 2015;379:226-231. doi:10.1016/j.jmmm.2014.12.054
 158. Roca AG, Marco JF, Del Puerto Morales M, Serna CJ. Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. *J Phys Chem C*. 2007;111(50):18577-18584. doi:10.1021/jp075133m
 159. Hu P, Kang L, Chang T, et al. High saturation magnetization Fe₃O₄ nanoparticles prepared by one-step reduction method in autoclave. *J Alloys Compd*. 2017;728:88-92. doi:10.1016/j.jallcom.2017.08.290
 160. Kim KJ, Choi S, Lee JH, Lee HJ, Park JY. Variations of the Electronic, Optical and Magnetic Properties Caused by V Doping in Magnetite Thin Films. *J Korean Phys Soc*. 2007;51(3):1138. doi:10.3938/jkps.51.1138
 161. Cullity BD, Stock SR. *Elements of X-Ray Diffraction*. Vol 108. Third Edit. Edinburgh: Pearson; 2014.
 162. Mourdikoudis S, Pallares RM, Thanh NTK. Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. *Nanoscale*. 2018;10(27):12871-12934. doi:10.1039/c8nr02278j
 163. Eastoe J, Hollamby MJ, Hudson L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2006;128-130(2006):5-15. doi:10.1016/j.cis.2006.11.009
 164. Ardelean IL, Stoencea LBN, Fikai D, et al. Development of Stabilized Magnetite Nanoparticles for Medical Applications. *J Nanomater*. 2017;2017. doi:10.1155/2017/6514659
 165. Fikai D, Andronescu E, Fikai A, et al. Synthesis and Characterization of Mesoporous Magnetite Based Nanoparticles. *Curr Nanosci*. 2012;8(6):875-879. doi:10.2174/157341312803989114
 166. Benarie M. *Analytical Uses of Immobilized Biological Compounds for Detection, Medical and Industrial Uses*. Vol 77.; 1988. doi:10.1016/0048-

9697(88)90067-8

167. Birsan C, Predoi D, Andronescu E. IR and thermal studies of iron oxide nanoparticles in a bioceramic matrix. *J Optoelectron Adv Mater.* 2007;9(6):1821-1824.
168. Samoila P, Cojocaru C, Cretescu I, et al. Nanosized spinel ferrites synthesized by sol-gel autocombustion for optimized removal of azo dye from aqueous solution. *J Nanomater.* 2015;2015(June). doi:10.1155/2015/713802
169. Katsyuba S, Dyson P, Vandyukova E, Chernova A, Vidi? A. Molecular Structure, Vibrational Spectra, and Hydrogen Bonding of the Ionic Liquid 1-Ethyl-3-methyl-1H-imidazolium Tetrafluoroborate. *Helv Chim Acta.* 2004;87(10):2556-2565. doi:10.1002/hlca.200490228
170. Tabrizi AB, Teymurlouie ND. Application of sodium dodecyl sulfate coated iron oxide magnetic nanoparticles for the extraction and spectrofluorimetric determination of propranolol in different biological samples. *J Mex Chem Soc.* 2016;60(3):108-116.
171. Garkoti C, Shabir J, Mozumdar S. An imidazolium based ionic liquid supported on Fe₃O₄@SiO₂ nanoparticles as an efficient heterogeneous catalyst for N-formylation of amines. *New J Chem.* 2017;41(17):9291-9298. doi:10.1039/c6nj03985e
172. Shao H, Zhou Y, Qi J, Hu P, He J. Characterization of Fe₃O₄/γ-Fe₂O₃@SiO₂ Core-Shell Structure Composite Magnetic Fluid by Microemulsion Method. *J Supercond Nov Magn.* 2019;32(2):247-252. doi:10.1007/s10948-018-4910-6
173. Arévalo-Cid P, Isasi J, Martín-Hernández F. Comparative study of core-shell nanostructures based on amino-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ and CoFe₂O₄@SiO₂ nanocomposites. *J Alloys Compd.* 2018;766:609-618. doi:10.1016/j.jallcom.2018.06.246
174. Vidal-Vidal J, Rivas J, López-Quintela MA. Synthesis of monodisperse maghemite nanoparticles by the microemulsion method. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2006;288(1-3):44-51. doi:10.1016/j.colsurfa.2006.04.027
175. Blackman LD, Gunatillake PA, Cass P, Locock KES. An introduction to zwitterionic polymer behavior and applications in solution and at surfaces. *Chem Soc Rev.* 2019;48(3):757-770. doi:10.1039/c8cs00508g
176. Kraynov A, E. T. Concepts for the Stabilization of Metal Nanoparticles in Ionic Liquids. In: *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology.* ; 2011. doi:10.5772/22111

177. Knothe G. Monitoring a progressing transesterification reaction by fiber-optic near infrared spectroscopy with correlation to ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Oil Chem Soc.* 2000;77(5):489-493. doi:10.1007/s11746-000-0078-5
178. Rosset D V., Wancura JHC, Ugalde GA, et al. Enzyme-Catalyzed Production of FAME by Hydroesterification of Soybean Oil Using the Novel Soluble Lipase NS 40116. *Appl Biochem Biotechnol.* 2019;188(4):914-926. doi:10.1007/s12010-019-02966-7
179. Rezaei K, Jenab E, Temelli F. Effects of water on enzyme performance with an emphasis on the reactions in supercritical fluids. *Crit Rev Biotechnol.* 2007;27(4):183-195. doi:10.1080/07388550701775901
180. Nieva-Echevarría B, Goicoechea E, Manzanos MJ, Guillén MD. A method based on ^1H NMR spectral data useful to evaluate the hydrolysis level in complex lipid mixtures. *Food Res Int.* 2014;66:379-387. doi:10.1016/j.foodres.2014.09.031
181. Palomo JM, Muoz G, Fernández-Lorente G, Mateo C, Fernández-Lafuente R, Guisán JM. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): Immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. *J Mol Catal B Enzym.* 2002;19(20):279-286. doi:10.1016/S1381-1177(02)00178-9
182. Adlercreutz P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev.* 2013;42(15):6406-6436. doi:10.1039/c3cs35446f
183. Pereira F, Pereira-Filho E. APLICAÇÃO DE PROGRAMA COMPUTACIONAL LIVRE EM PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS: UM TUTORIAL. *Quim Nova.* 2018;2018(9):1061-1071. doi:10.21577/0100-4042.20170254
184. Silva C, Martins M, Jing S, Fu J, Cavaco-Paulo A. Practical insights on enzyme stabilization. *Crit Rev Biotechnol.* 2018;38(3):335-350. doi:10.1080/07388551.2017.1355294
185. Betancor L, López-Gallego F, Alonso-Morales N, et al. Glutaraldehyde in Protein Immobilization. 2006:57-64. doi:10.1007/978-1-59745-053-9_5
186. Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. *RSC Adv.* 2014;4(4):1583-1600. doi:10.1039/c3ra45991h
187. Lima LN, Oliveira GC, Rojas MJ, et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015;42(4):523-535. doi:10.1007/s10295-015-

1586-9

188. Desai PD, Dave AM, Devi S. Entrapment of lipase into K-carrageenan beads and its use in hydrolysis of olive oil in biphasic system. *J Mol Catal B Enzym.* 2004;31(4-6):143-150. doi:10.1016/j.molcatb.2004.08.004
189. Guzik U, Hupert-Kocurek K, Wojcieszynska D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases. *Molecules.* 2014;19(7):8995-9018. doi:10.3390/molecules19078995
190. Molina G, Inamuddin, Pelissari FM, Asiri AM. *Food Applications of Nanotechnology.* 1st ed. (Molina G, Inamuddin, Pelissari FM, Asiri AM, eds.). CRC Press; 2019. doi:10.1201/9780429297038
191. Ghesti GF, De Macedo JL, Resck IS, Dias SCL, Dias JA. FT-Raman spectroscopy quantification of biodiesel in a progressive transesterification reaction and its correlation with ¹H NMR spectroscopy methods. *ACS Natl Meet B Abstr.* 2007;21(5):795-800.
192. Pedro KCNR, Parreira JM, Correia IN, Henriques CA, Langone MAP. Enzymatic biodiesel synthesis from acid oil using a lipase mixture. *Quim Nova.* 2018;41(3):284-291. doi:10.21577/0100-4042.20170180
193. Norjannah B, Ong HC, Masjuki HH, Juan JC, Chong WT. Enzymatic transesterification for biodiesel production: A comprehensive review. *RSC Adv.* 2016;6(65):60034-60055. doi:10.1039/c6ra08062f
194. Devanesan MG, Viruthagiri T, Sugumar N. Transesterification of Jatropha oil using immobilized *Pseudomonas fluorescens*. *African J Biotechnol.* 2007;6(21):2497-2501.
195. Nawani N, Singh R, Kaur J. Immobilization and stability studies of a lipase from thermophilic *Bacillus* sp: The effect of process parameters on immobilization of enzyme. *Electron J Biotechnol.* 2006;9(5):559-565. doi:10.2225/vol9-issue5-fulltext-9
196. Hoarau M, Badiéyan S, Marsh ENG. Immobilized enzymes: Understanding enzyme-surface interactions at the molecular level. *Org Biomol Chem.* 2017;15(45):9539-9551. doi:10.1039/c7ob01880k
197. Ferrero GO, Sánchez Faba EM, Rickert AA, Eimer GA. Alternatives to rethink tomorrow: Biodiesel production from residual and non-edible oils using biocatalyst technology. *Renew Energy.* 2019. doi:10.1016/j.renene.2019.12.114
198. Cubides-Roman DC, Pérez VH, de Castro HF, et al. Ethyl esters (biodiesel) production by *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. *Fuel.* 2017;196:481-487.

doi:10.1016/j.fuel.2017.02.014

199. Liu X, Chen X, Li Y, Cui Y, Zhu H, Zhu W. Preparation of superparamagnetic sodium alginate nanoparticles for covalent immobilization of *Candida rugosa* lipase. *J Nanoparticle Res.* 2012;14(3). doi:10.1007/s11051-012-0763-2
200. López-Muñoz GA, Pescador-Rojas JA, Ortega-Lopez J, Salazar JS, Abraham Balderas-López J. Thermal diffusivity measurement of spherical gold nanofluids of different sizes/concentrations. *Nanoscale Res Lett.* 2012;7(July). doi:10.1186/1556-276X-7-423
201. Reimers JR, Ford MJ, Halder A, Ulstrup J, Hush NS. Gold surfaces and nanoparticles are protected by Au(0)-thiyl species and are destroyed when Au(I)-thiolates form. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113(11):E1424-E1433. doi:10.1073/pnas.1600472113
202. Kumar A, Mandal S, Selvakannan PR, Pasricha R, Mandale AB, Sastry M. Investigation into the interaction between surface-bound alkylamines and gold nanoparticles. *Langmuir.* 2003;19(15):6277-6282. doi:10.1021/la034209c
203. Volpato G, Filice M, Ayub MAZ, Guisan JM, Palomo JM. Single-step purification of different lipases from *Staphylococcus warneri*. *J Chromatogr A.* 2010;1217(4):473-478. doi:10.1016/j.chroma.2009.11.055
204. Xavier J, Vincent S, Meder F, Vollmer F. Advances in optoplasmonic sensors - Combining optical nano/microcavities and photonic crystals with plasmonic nanostructures and nanoparticles. *Nanophotonics.* 2018;7(1):1-38. doi:10.1515/nanoph-2017-0064
205. Bastiaansen C, Schmidt HW, Nishino T, Smith P. Transparency and dichroism of ultra-drawn UHMW-PE films in the visible wavelength range. *Polymer (Guildf).* 1993;34(18):3951-3954. doi:10.1016/0032-3861(93)90526-G
206. Yang Z, Song J, Dai Y, et al. Self-assembly of semiconducting-plasmonic gold nanoparticles with enhanced optical property for photoacoustic imaging and photothermal therapy. *Theranostics.* 2017;7(8):2177-2185. doi:10.7150/thno.20545
207. Song J, Yang X, Jacobson O, et al. Sequential Drug Release and Enhanced Photothermal and Photoacoustic Effect of Hybrid Reduced Graphene Oxide-Loaded Ultrasmall Gold Nanorod Vesicles for Cancer Therapy. *ACS Nano.* 2015;9(9):9199-9209. doi:10.1021/acsnano.5b03804
208. Fernandez-Lafuente R, Rosell CM, Rodriguez V, Guisan JM. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. *Enzyme Microb Technol.* 1995;17(6):517-523. doi:10.1016/0141-

0229(94)00090-E

209. Mohamad NR, Marzuki NHC, Buang NA, Huyop F, Wahab RA. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2015;29(2):205-220. doi:10.1080/13102818.2015.1008192
210. Godoy CA, De Las Rivas B, Guisán JM. Site-directing an intense multipoint covalent attachment (MCA) of mutants of the *Geobacillus thermocatenulatus* lipase 2 (BTL2): Genetic and chemical amination plus immobilization on a tailor-made support. *Process Biochem.* 2014;49(8):1324-1331. doi:10.1016/j.procbio.2014.04.020

Apêndice A

Síntese do Líquido Iônico (L.I.)

A síntese do líquido iônico ocorre por meio de uma reação de substituição nucleofílica do tipo SN_2 em que foi obtido rendimento igual a 96%. Pelo espectro de RMN de 1H obtido para o líquido iônico (FIGURAA.1), observa-se a elevada pureza do material após recristalização em tolueno gelado, descartando outras formas de purificação. O espectro apresenta multipletos em $\delta 0.9$ ppm com integração 3, em $\delta 1.3$ ppm com integração 14 e em $\delta 1.9$ ppm com integração 2 referentes a cadeia alquílica, apresenta ainda um tripleto em $\delta 4.3$ ppm referente aos hidrogênios do carbono da cadeia alquílica ligado ao 1-metilimidazol com integração 2 e em $\delta 4.1$ ppm verifica-se um singlete referente ao metil ligado ao imidazol de integração 3. Na região aromática é possível verificar sinais correspondentes aos hidrogênios do heterocíclico do 1-metilimidazol, no qual observa-se um maior deslocamento químico do próton do carbono ligado aos dois nitrogênios, em $\delta 10.3$ ppm, devido a desproteção ocasionada pelos átomos eletronegativos.

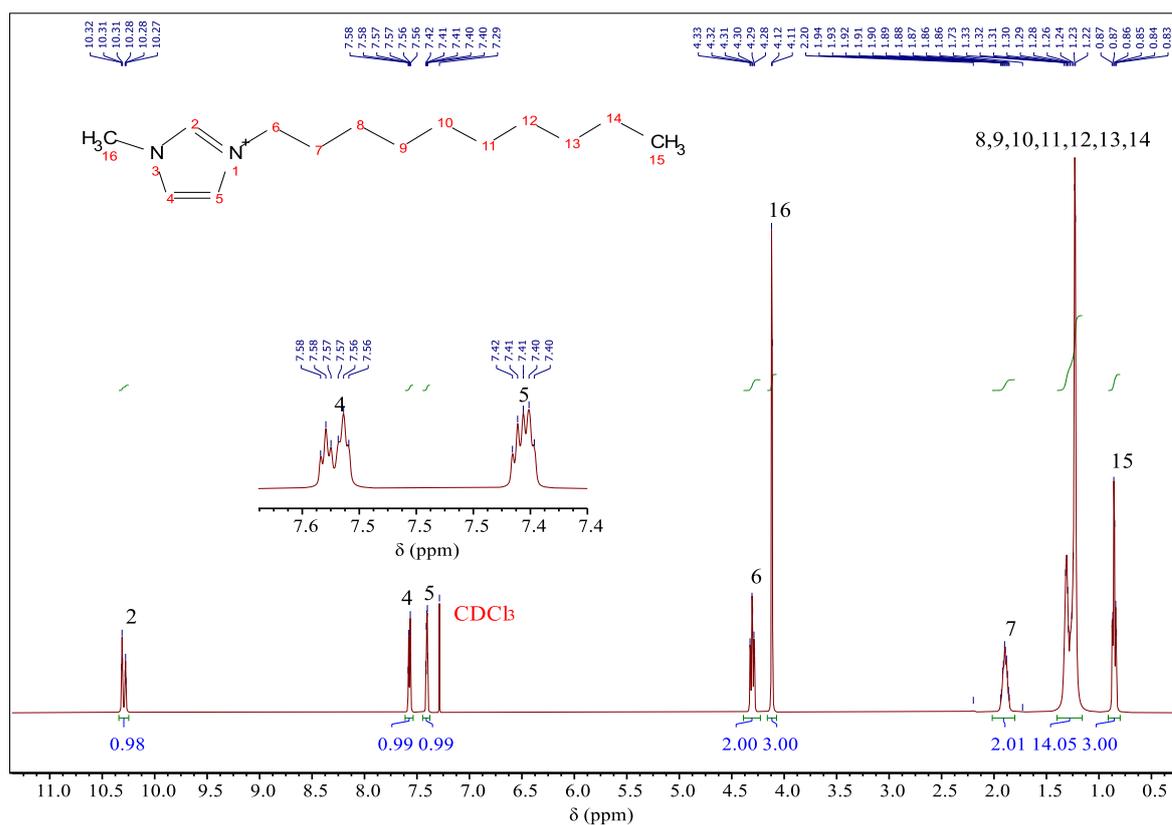


FIGURA A. 1: Espectro de RMN de ^1H do liquido iônico ImC_{10} em CDCl_3 com aquisição de pontos de 64 K.

Apêndice B

TABELA B. 1: Distância interplanar, parâmetro de célula e volume da célula unitária calculados para as nanopartículas sintetizadas na presença dos estabilizantes.

	<i>Distancia Interplanar (d) / Å</i>	<i>Parâmetro de rede (a) / Å</i>	<i>Volume da Célula Unitária / Å³</i>
<i>Fe₃O₄-Cit</i>	2.5254	8.3760	587.644
<i>Fe₃O₄-ImC₁₀</i>	2.5309	8.3942	591.479
<i>Fe₃O₄-ImSC₁₀</i>	2.5270	8.3813	588.768

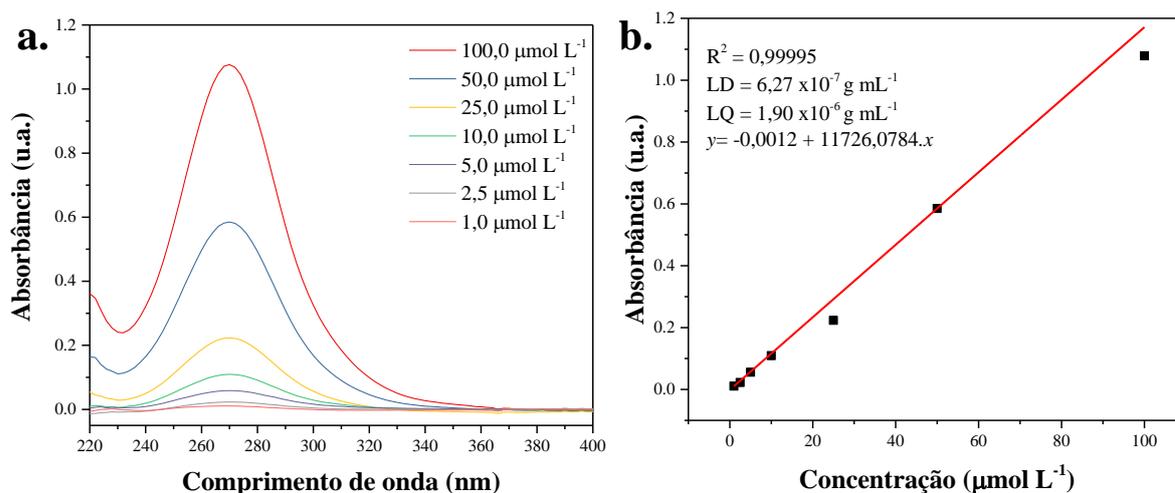


FIGURA B. 1: Espectro de absorção UV-vis do 4-benzaldeído para concentrações na faixa de 1-100 μmol.L⁻¹ (a) e Curva analítica para o 4-benzaldeído em $\lambda_{\text{max}} = 282 \text{ nm}$ (1-100 μmolL⁻¹)(b).

TABELA B. 2: Erro experimental, erro de um efeito e a variância calculados nos valores de conversão do ponto central para cada nanopartícula.

	<i>Fe₃O₄-Cit</i>	<i>Fe₃O₄-ImC₁₀</i>	<i>Fe₃O₄-ImSC₁₀</i>	<i>Fe₃O₄-Gli</i>	<i>Fe₃O₄-HPO₃</i>
<i>Variância</i>	0,564	0,001	0,246	5,452	6,784

<i>Erro Experimental</i>	0,751	0,033	0,496	2,334	2,604
<i>Erro de um efeito</i>	0,153	0,006	0,101	0,476	0,531

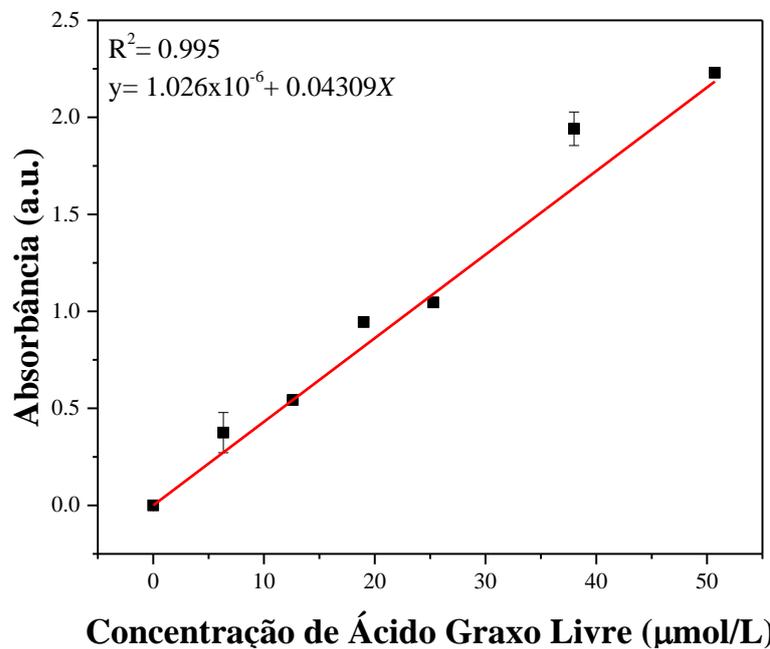
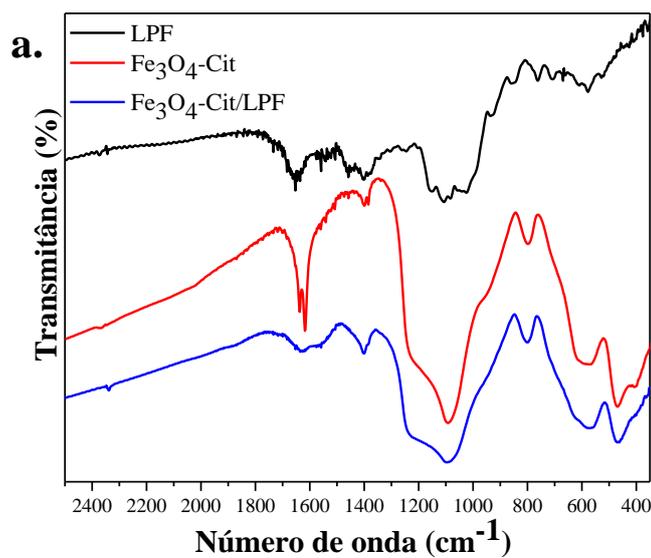


FIGURA B. 2: Curva analítica para quantificação de ácido graxo $\lambda_{\text{max}} = 715$ nm. Foi usado como padrão o ácido oleico nas concentrações de 0-50 μmolL^{-1} .



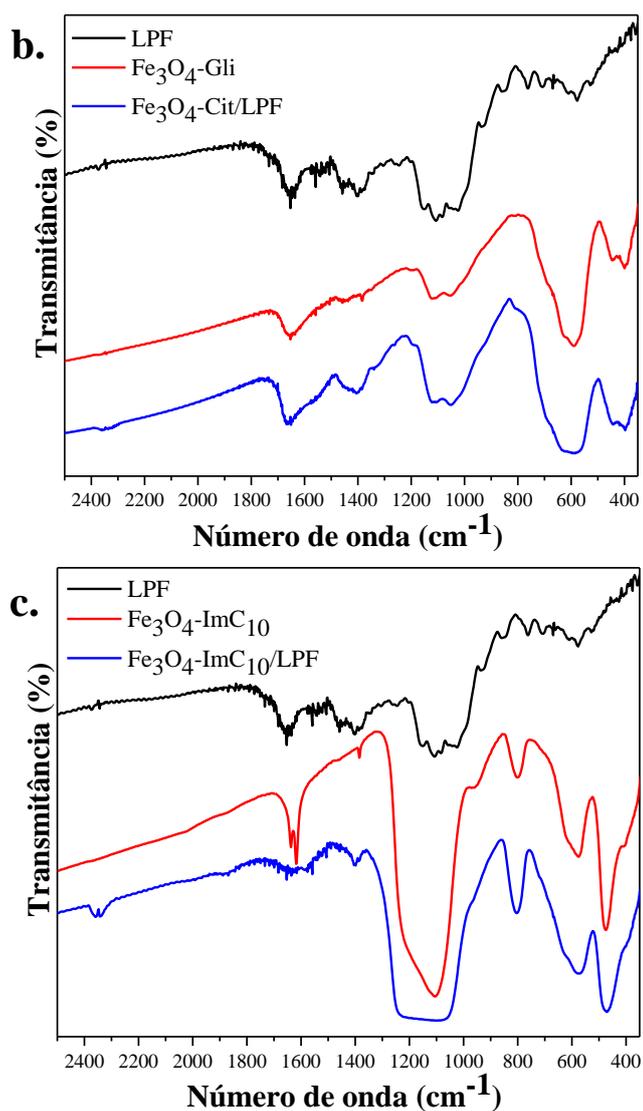


FIGURA B. 3: Espectro de FTIR para das nanopartículas otimizadas após a imobilização: $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Cit}$ (a), $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Gli}$ (b) e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-ImC}_{10}$ (c). Em preto estão apresentados o espectro de FTIR da lipase de *Pseudomonas Fluorescens* (LPF) livre.

Apêndice C

Caracterização das Nanopartículas Obtidas por Colaboração (Fe_3O_4 -Gli e Fe_3O_4 -HPO)

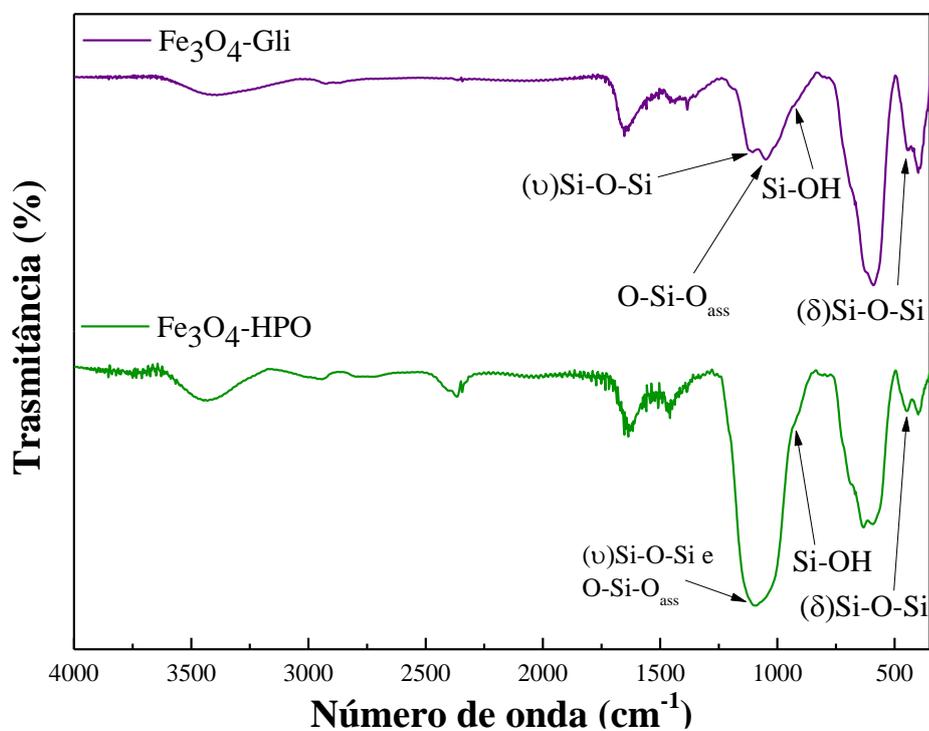


FIGURA C. 1: Espectro de FTIR para as nanopartículas de Fe_3O_4 -Gli e Fe_3O_4 -HPO

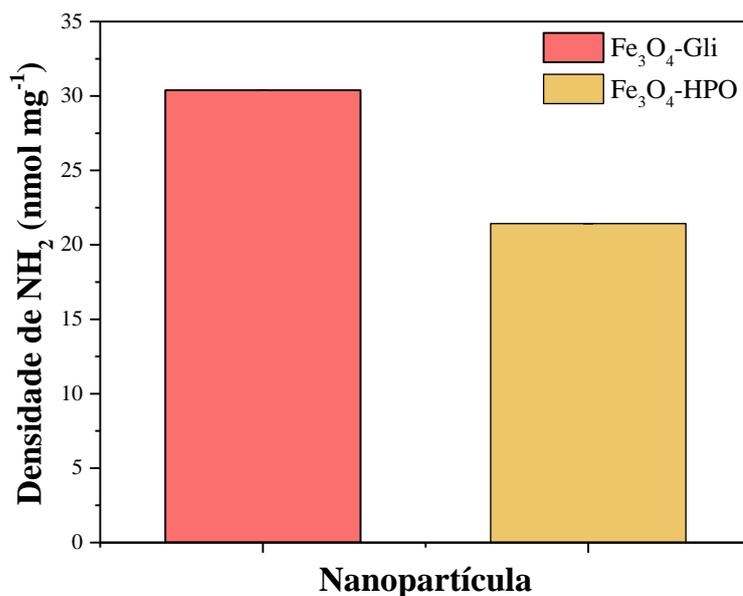


FIGURA C. 2: Densidade de grupos amino para as nanopartículas funcionalizadas obtidas por colaboração (Fe_3O_4 -Gli e Fe_3O_4 -HPO).