UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – USP/EEL

Heitor Buzetti Simões Bento

Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)

> Lorena 2015

HEITOR BUZETTI SIMÕES BENTO

Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)

> Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos

Orientador: Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira

Versão Original

Lorena 2015 AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

> Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado da Escola de Engenharia de Lorena, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bento, Heitor Buzetti Simões Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) / Heitor Buzetti Simões Bento; orientador Pedro Carlos Oliveira - Versão Original. - Lorena, 2015. 94 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Processos Catalíticos e Biocatalíticos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2015 Orientador: Pedro Carlos Oliveira

Biocatalisador. 2. Lipases imobilizadas. 3.
 Poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado. 4.
 Partículas magnéticas. 5. Imobilização de enzimas. I.
 Título. II. Oliveira, Pedro Carlos, orient.

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre confiarem e apoiarem minhas decisões e sonhos

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e ter me concedido forças e capacidade para chegar até aqui.

Aos meu pais, André e Naara, e minha irmã, Camille, pelo amor incondicional e apoio em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira, meu orientador. Obrigado pela orientação, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelos ensinamentos, conversas, atenção, paciência e confiança em meu trabalho.

À Prof^a Dr^a Heizir Ferreira de Castro e à Prof^a Dr^a Larissa de Freitas, pelas inúmeras contribuições ao trabalho, pela disponibilidade e apoio.

Aos meus amigos Bruno Santos, Edward Zanoello Jr, Thiago Ribeiro e Thiago Vieira, por serem minha segunda familia e tornar meus dias melhores.

Ao amigo Prof. Dr. Bruno Gambarato, pela amizade e ajuda com algumas análises e discussões.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que me acompanharam e me ajudaram nesta etapa: Dr^a Ana Karine, Annie, Braz, Charles, Cíntia, Dr^a Daniela, Fábio, Flávia, Guilherme, Lucas, Prof^a Dr^a Patrícia Da Rós, Dr. Rafael Vieira, Renata, Sara.

Aos familiares e amigos que torceram e continuam torcendo pelas minhas conquistas.

RESUMO

BENTO, H. B. S. Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno). 2015.
94p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2015.

Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar uma matriz híbrida estável de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado pela adição de magnetita (Fe₃O₄) e avaliar seu potencial como suporte para a imobilização de lipases. A matriz híbrida foi sintetizado pela técnica de polimerização em suspensão utilizando dos monômeros de estireno e divinilbenzeno e ao qual foram adicionadas partículas de magnetita preparadas por coprecipitação dos íons Fe⁺² e Fe⁺³. A caracterização foi realizada pelas técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), difratometria de raios-X (DRX) e magnetização de amostra vibrante (VSM), comparando os materiais magnetizados e não magnetizados. Os biocatalisadores foram preparados pela imobilização da lipase de Candida rugosa (LCR) e lipase PS Burkholderia cepacia (LPS) via adsorção física e foram caracterizados em função da influência de pH e temperatura na atividade hidrolítica, parâmetros cinéticos, estabilidade térmica, estabilidade operacional e estabilidade de estocagem. O derivado de LCR foi aplicado em reações de esterificação e o derivado de LPS em reações de transesterificação. Os resultados obtidos pelas análises de FTIR, DRX e VSM confirmaram que a magnetita foi incorporada ao polímero, gerando atração das partículas por um campo magnético externo. A caracterização bioquímica indicou forte influência do pH na atividade hidrolítica, apresentando ponto ótimo próximo a 8,0 tanto para as lipases livres quanto imobilizadas. Os biocatalisadores magnetizados preparados apresentaram bom desempenho em todos os aspectos, o derivado da lipase de Candida rugosa alcançou conversões entre 89-94% nas reações de esterificação, revelando tempo de meia vida de t_{1/2}=52 dias na estabilidade operacional. O derivado de Burkholderia cepacia atingiu rendimentos próximos a 80% nas reações de transesterificação com $t_{1/2}$ =40 dias. A imobilização aumentou a estabilidade térmica das lipases em 50 vezes no caso da LCR e em 2,3 vezes para a LPS. Estes resultados indicam que o material híbrido magnetizado sintetizado possui grande potencial para ser utilizado como suporte na imobilização de enzimas com aplicação em reações de interesse industrial.

Palavras-chave: Biocatalisador; Partículas Magnéticas; Poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado; Imobilização de Enzimas.

ABSTRACT

BENTO, H. B. S. Preparation and characterization of biocatalysts based on lipases immobilized on magnetic particles of poly(styrene-co-divinylbenzene). 2015. 94p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2015.

This study aimed to synthesize and characterize a stable hybrid matrix of poly (styrene-codivinylbenzene) magnetized by the addition of magnetite (Fe3O4) and evaluate its potential for application in the immobilization of lipases, by characterization of the prepared biocatalysts. The support was synthesized by the suspension polymerization technique by applying styrene and divinylbenzene monomers and adding magnetite particles synthesized by co-precipitation of Fe + 2 and Fe + 3. The characterization of the material was performed by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray diffraction (XRD), vibrating sample magnetization (VSM), by comparison of the magnetized and the not magnetized particles. The biocatalysts were prepared by immobilization of lipase from Candida rugosa (CRL) and lipase from Burkholderia cepacia (Lipase PS) via physical adsorption and they were characterized according to the influence of pH and temperature on the hydrolytic activity, kinetic parameters, thermal stability, operational stability and storage stability. The CRL derivative was applied in esterification reactions and the lipase PS derivative was applied in transesterification reactions. The results obtained by the analysis FTIR, XRD and VSM confirmed the magnetite was successfully incorporated into the polymer and generated the atraction for an external magnetic field. Biochemical characterization indicated a strong influence of pH on the hydrolytic activity, showing better results on pH around 8,0 for free and both immobilized lipases. The magnetized biocatalysts prepared had good performance in all respects, derivative from Candida rugosa lipase reached 89-94% conversion in esterification reactions showing half-life of operational stability $t_{1/2} = 52$ days. The immobilized lipase from Burkholderia cepacia reached yields close to 80% in transesterification reactions presenting $t_{1/2} = 40$ days. Immobilization increased the thermal stability of lipase by 50 times in the case of CRL and 2,3 times for Lipase PS. These results indicate that the magnetized hybrid material synthesized has great potential to be used as a support for the immobilization of enzymes for use in reactions of industrial interest.

Keywords: Biocatalysts; Magnetic particles; Magnetized poly(styrene-co-divinylbenzene); Enzyme immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema representativo da formação do Poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos			
monômeros de Estireno e Divinilbenzeno			
Figura 2 - Aparato experimental das reações de polimerização			
igura 3 - Fluxograma simplificado da co-preciptação dos íons Fe ⁺² e Fe ⁺³			
Figura 4 - Etapas da modificação da superfície da magnetita com ácido oleico			
Figura 5- Imagens do copolímero STY-DVB; a) Sem ampliação; b) Ampliação de 50 x em			
nicroscópio óptico; c) Ampliação de 100 x em microscópio óptico ⁴			
Figura 6 - Suporte de STY-DVB magnetizado sendo atraído por imã (campo magnético externo).46			
Figura 7 - Interação da magnetita com ácido oleico			
Figura 8 - Teste de comparação da magnetita, como obtida, e magnetita modificada com ácido			
oleico, em mistura 1:1 de água:heptano; a) Magnetita sem modificação; b) Magnetita modificada			
com ácido oleico			
Figura 9- Imagens de MEV: suporte STY-DVB ampliado 100x (a) e ampliado 500x (c) e do			
derivado imobilizado ampliado 100x (b) e ampliado 500x (d) 50			
Figura 10 - Imagens de MEV: suporte STY-DVB magnetizado ampliado 100x (a) e ampliado 500x			
(c) e do derivado imobilizado ampliado 100x (b) e ampliado 500x (d) 51			
Figura 11- Foto de microscopia óptica do polímero magnetizado utilizando agente de suspensão			
2% de PVA (m/v)			
Figura 12 - Difratogramas de raios-X dos suportes sintetizados			
Figura 13 - Espectros de FTIR das amostras de magnetita e magnetita modificada com ácido oleico.			
Figura 14 - Espectros de FTIR para as amostras de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e			
não magnetizado			
Figura 15 - Curva de Histerese das partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) sintetizadas 55			
Figura 16- Superfície de resposta obtida para a influência de pH e temperatura na atividade da			
lipase de <i>Candida rugosa</i> na forma livre			
Figura 17 - Gráfico de otimização de atividade hidrolítica da lipase de Candida rugosa livre em			
relação a pH e temperatura			
Figura 18 - Gráfico de Pareto de análise dos efeitos dos fatores estudados em relação a lipase de			
Candida rugosa imobilizada no suporte STY-DVB			
Figura 19 - Gráfico de Pareto referente a análise dos efeitos dos fatores estudados em relação a			
lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em STY-DVB magnetizado			
Figura 20 - Gráficos da relação das atividades hidrolíticas da lipase de <i>Candida rugosa</i> , livre e			
imobilizada, com variação da concentração do substrato, e ajuste ao modelo de Michaellis-Menten:			
a) Livre; b) Imobilizada em STY-DVB; c) Imobilizada em STY-DVB magnetizado			
Figura 21- Conversões obtidas nas reações de esterificação reutilizando o mesmo biocatalisador por			
7 bateladas consecutivas			
7 bateladas consecutivas			

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Suporte para imobilização de enzimas	. 21
Tabela 2- Técnicas de imobilização de enzimas.	. 26
Tabela 3 - Estudos de lipases imobilizadas em poli(estireno-co-divinilbenzeno) e em suportes	
magnéticos.	. 28
Tabela 4 - Principais equipamentos utilizados na realização do trabalho	. 32
Tabela 5- Formulação utilizada nas reações de polimerização	. 34
Tabela 6 - Níveis reais e codificados para as variáveis pH e temperatura avaliados utilizando	
planejamento experimental.	. 40
Tabela 7 - Planejamento experimental utilizado na análise da influência de pH e temperatura	. 40
Tabela 8 - Variação nas concentrações do substrato	. 41
Tabela 9- Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental para a esterificação do	
Butirato de n-Butila	. 42
Tabela 10 - Substratos preparados a partir do planejamento experimental	. 42
Tabela 11- Atividades hidrolíticas e rendimentos de imobilização obtidos para imobilização de	
lipase de <i>Candida rugosa</i> em diferentes faixas de tamanho dos suportes.	. 48
Tabela 12 - Valores de área superficial obtidos na análise B.E.T.	. 49
Tabela 13- Respostas obtidas no planejamento experimental para analisar a influência dos fatore	s A
(temperatura, $^{\circ}C$) e B (pH) na atividade hidrolítica (U g ⁻¹) da lipase de <i>Candida rugosa</i> na forma	ι
livre e imobilizada em STY-DVB e em STY-DVB magnetizado.	. 57
Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos para a lipase de <i>Candida rugosa</i>	
livre, sob um nível de confiança de 95%.	. 57
Tabela 15- Valores das constantes cinéticas obtidas para a lipase de <i>Candida rugosa</i> livre e	
imobilizada e seus respectivos coeficientes de correlação dos dados ao modelo de Lineweaver-	
Burke	. 63
Tabela 16- Constantes de desativação térmica (incubamento a 60 °C) e tempos de meia-vida para	a a
lipase de Candida rugosa livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado	. 64
Tabela 17 - Atividades hidrolíticas e rendimentos de imobilização obtidos para lipase PS de	
Burkholderia cepacia livre e imobilizada	. 66
Tabela 18 -Respostas obtidas no planejamento experimental para analisar a influência dos fatore	s A
(temperatura, °C) e B (pH) na atividade hidrolítica (U g-1) da lipase de Burkholderia cepacia na	
forma livre e imobilizada em STY-DVB e em STY-DVB magnetizado	. 67
Tabela 19 - Análise de Variância (ANOVA) em função de atividade hidrolítica com variação de	pН
e temperatura utilizando a LPS na forma livre, sob o nível de 95% de confiança	. 69
Tabela 20- Análise de Variância (ANOVA) em função de atividade hidrolítica com variação de p	pН
e temperatura utilizando a LPS imobilizada em STY-DVB, sob o nível de 95% de confiança	. 69
Tabela 21 - Análise de Variância (ANOVA) em função de atividade hidrolítica com variação de	pН
e temperatura utilizando a LPS imobilizada em STY-DVB magnetizado, sob o nível de 95% de	
confiança	. 70
Tabela 22 - Valores das constantes cinéticas obtidas para a LPS livre e imobilizada e seus	
respectivos coeficientes de correlação dos dados ao modelo de Lineweaver-Burke	. 74
Tabela 23 - Constantes de desativação térmica (incubamento a 60 °C) e tempos de meia-vida par	a a
lipase de Burkholderia cepacia livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado	. 74
Tabela 24- Atividade de esterificação, produtividade e conversão molar das reações de	
esterificação	. 78
Tabela 25 - Conversões molares obtidas ao decorrer do tempo para as reações de esterificação	. 79
Tabela 26 - Análise de Variância (ANOVA) do planejamento experimental das esterificações	. 80

LISTA DE ABREVIAÇÕES

AIBN	Azobisisobutironitrila
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
LCR	Lipase de Candida rugosa
LPS	Lipase de Burkholderia cepacia
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
PVA	Álcool Polivinílico
STY-DVB	Poli(estireno-co-divinilbenzeno)
STY-DVB-M	Poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado
VSM	Magnetômetro de Amostra Vibrante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Biocatálise	18
3.2 Enzimas	18
3.2.1 Lipases	19
3.3 Lipases imobilizadas	19
3.4 Suportes para imphilização	
3 5 Polímeros e Técnicas de polimerização	22
3.6 Compósitos magnéticos	24
3 7 Partículas magnéticas e suas propriedades	24
3 8 Técnicas de Imobilização	25
3.8.1 Adsorcão física	<u>-</u> 0 26
3.8.2 Imobilização por ligação covalente	20
3 8 3 Aprisionamento e microencansulação	<u>2</u> 0 29
3.8.4 Ligação cruzada	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	
4. MATERIAIS E METODOS	31
4.1.1 Materiais para a síntese dos suportes	31
4.1.1 Matchais para a sincese dos suportes	31
4.2 Equipamentos	51
4.2 Equipanentos	22
4.5 Metodologia Experimental	52
4.3.2 Síntasa da suporta da poli(astirano co divinilhanzano)	52 22
4.3.2 Síntese do suporte de poli(estireno co divinilhenzeno) magnetizado com magnetita (Eq. O	52
4.5.5 Sintese do Suporte de pon(estiteno-co-divinitoenzeno) magnetizado com magnetita ($1^{\circ}30^{\circ}$	4) 54 3/
4.3.5 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico	54
4.3.7 Síntasa da ástar butirata da n butila	55 72
4.3.7 Sintese do ester butiliato de n-butila	57 72
4.5.8 Sintese dos esteres alquincos via transesterinteação enzimatica	57 72
4.4 Metodos de Allalise	וכ דב
4.4.2 Apólico de óreo superficiel (PET)	57
4.4.2 Analise de alea superioria (D.E.T.)	30 20
4.4.5 Microscopia Eletronica de Valledura (MEV)	30
4.4.5 Espectroscopia na ragião do Infravormelho por Transformada de Equriar (ETIP)	
4.4.5 Espectroscopia na região do initavermento por Transformada de Fourier (FTIK)	20
4.4.0 Analise de magnetização (curva de misterese)	39
4.4.7 Determinação de atividade enzimatica.	
4.4.0 Caracterização das propriedades cináticas das lipasas livras a imphilizadas	59 /1
4.4.9 Caracterização da astabilidada tármica dos biocatalisadoras	4 1 /1
4.4.10 Calacterização da estabilidade termica dos biocatarisadores	41
4.4.11 influencia da fazao monar e concentração dos feagentes na sintese do butilato de n-butila	40
4 4 12 A companhamento des receões de esterificação	42
5 DESLITADOS E DISCUSSÕES	45
5.1 Condições reacionais de síntese de conclímero STV DVD	 44
5.2 Reacões de polimerização com adição de partículas magnáticas	44 15
5.2 Influêncie de temenho des portículos de superte na implificação	43 71
5.5 influencia do tamanno das particulas de suportes magnetizadas a não magnetizadas	/+ /0
5.4 Caracterização e comparação dos suportes magnetizados e não magnetizados	40 ۱۰
5.4.2 Microscopia Eletrôpica de Vorredure (MEV)	4ð 40
5.4.2 INICIOSCOPIA ELEUOINCA UE V ALLEUULA (IVIE V)	49 50
J.4.J DIIIayau ut Kalus-A	32

5.4.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	3
5.4.5 Análise de magnetização	5
5.5 Caracterização e comparação dos derivados imobilizados da lipase de Candida rugosa	6
5.5.1 Análise da influência de pH e temperatura	6
5.5.2 Determinação dos Parâmetros Cinéticos	1
5.5.3 Estabilidade Térmica	3
5.5.4 Estabilidade operacional e de estocagem da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em STY-	
DVB magnetizado	4
5.6 Caracterização e comparação dos derivados imobilizados de Burkholderia cepacia	6
5.6.1 Análise da influência de pH e temperatura	6
5.6.2 Determinação dos Parâmetros Cinéticos	2
5.6.3 Estabilidade Térmica	4
5.6.4 Estabilidade operacional e de estocagem	4
5.7 Aplicação de lipase de Candida rugosa livre e imobilizada na síntese de ésteres	6
5.7.1 Influência da razão molar e quantidade de solvente na síntese de Butirato de n-Butila 76	8
5.7.2 Influência do carregamento enzimático na síntese de Butirato de n-Butila	1
6. CONCLUSÕES	3
REFERÊNCIAS	5
APENDICE	4

1. INTRODUÇÃO

O termo biocatálise se refere ao aproveitamento do potencial catalítico de microorganismos e enzimas para desenvolvimento de produtos de diversos segmentos de interesse industrial. A utilização de enzimas como biocatalisadores evoluiu expressivamente nos últimos anos devido ao dinamismo de aplicação (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005; TORRELO; HANEFELD; HOLLMANN, 2015).

A utilização de enzimas como catalisadores em substituição aos tradicionais catalisadores químicos apresenta diversas vantagens para o processo, como por exemplo, o fato das enzimas atuarem em condições reacionais brandas de temperatura, pressão, pH, etc. O processo enzimático ainda evita a geração de subprodutos devido a elevada especificidade das enzimas, tornando estes biocatalisadores ainda mais atraentes sob o ponto de vista industrial, diminuindo a contaminação dos efluentes e o impacto ambiental, uma vez que a preocupação com o meio ambiente continua crescendo a cada dia e já se tornou imprescindível que os processos químicos que causam danos ao meio ambiente sejam substituídos (BAUTISTA et al., 2015; POPPE et al., 2015; HASAN; SHAH; HAMMED, 2006).

Dentre as diversas enzimas aplicadas industrialmente, as lipases (triacilglicerol hidrolases, E.C.3.1.1.3) se destacam por serem biocatalisadores capazes de catalisar reações de hidrólise de óleos e gorduras além de reações reversas como esterificação e transesterificação e apresentam grande aplicação industrial, como no setor alimentício, farmacêutico, têxtil, cosmético e de detergentes (DE CASTRO et al., 2004; FREIRE; CASTILHO, 2000; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A utilização de enzimas em larga escala ainda é oneroso devido ao seu elevado custo, impedindo a difusão industrial destes biocatalisadores. Dessa forma a imobilização, técnica que retém a enzima em um suporte sólido, permite a sua reutilização ou uso contínuo no processo, diminuindo os custos totais.

A imobilização enzimática envolve basicamente 3 fatores: a enzima a ser imobilizada, o suporte e o método de imobilização. Existem diversos métodos de imobilização que são estudados e utilizados, porém deve ser realizado um estudo detalhado para seleção da enzima e do suporte, visto que as possibilidades de combinações são diversas. Pesquisas vem sendo realizadas com o intuito de obter biocatalisadores com elevada atividade catalítica e estabilidade térmica, viabilizando economicamente o bioprocesso, competindo assim com os processos convencionais utilizados industrialmente (GUISÁN, 2006).

Dentre os suportes estudados para imobilização de enzimas, os materiais híbridos ganham destaque por apresentarem a combinação de materiais orgânicos e inorgânicos. Nesta classe de materiais se encontram os compósitos magnéticos, constituídos basicamente por um núcleo magnético envolvido por uma camada de polímero. Estas partículas vem sendo estudadas para diversas finalidades, incluindo aplicações tecnológicas, industriais, ambientais, biológicas e médicas e no campo da biocatálise destacam-se por fornecerem um suporte para imobilização de biocatalisadores de fácil separação por meio da aplicação de um campo magnético externo (CAMILO, 2006; JOSÉ; PRADO, 2005; POLSHETTIWART et al., 2011).

Partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizadas possuem aplicação na imobilização de lipases como já demonstrado em trabalhos anteriores (SANTOS et al., 2007; SANTOS; DE CASTRO, 2006; OLIVEIRA; ALVES; DE CASTRO, 2000; OLIVEIRA et al., 2000; BRUNO et al., 2004; BRUNO; LIMA FILHO; DE CASTRO, 2008; MIJONE, 2014), indicando o potencial da combinação destas duas classes de materiais.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial de um suporte híbrido magnetizado para imobilização de enzimas, partindo da síntese e caracterização de biocatalisadores utilizando lipases imobilizadas em partículas de copolímero de estireno e divinilbenzeno magnetizado pela incorporação de óxidos de ferro, e aplicadas em reações de biotransformações.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral sintetizar uma matriz polimérica híbrida estável, composta por poli(estireno-co-divinilbenzeno) (STY-DVB) magnetizado por partículas de magnetita (Fe₃O₄), obtida pela co-precipitação de íons Fe²⁺ e Fe³⁺, e avaliar o potencial deste suporte na imobilização das lipases microbianas de *Candida rugosa* e de *Burkholderia cepacia*. O objetivo geral foi atingido após o cumprimento dos seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar uma matriz híbrida estável composta por poli(estireno-co-divinilbenzeno) e partículas de magnetita;
- Verificar o potencial de imobilização de diferentes lipases ao suporte sintetizado;
- Caracterizar morfologicamente o suporte sintetizado;
- Caracterizar os derivados imobilizados quanto aos parâmetros cinéticos e bioquímicos;
- Aplicar os derivados imobilizados em reações de biotransformações reversíveis, como esterificação e transesterificação.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biocatálise

A biotecnologia oferece um grande potencial na fabricação de bens de consumo que atende as mais diversas necessidades humanas. A tecnologia enzimática, uma sub-área da biotecnologia, está sendo aplicada para desenvolver produtos em larga escala e com alto valor agregado utilizando enzimas como catalisador, a fim de atender a necessidades em vários segmentos da indústria tais como alimentos (vinagre, queijo, bebidas, pão, entre outros), química fina (aminoácidos, proteínas) e farmacêutica (antivirais, medicamentos a base de amidas, diversos outros). Por outro lado, a bioconversão ou biocatálise consiste nas reações que utilizam biocatalisadores obtidos de diversas fontes, tais como culturas de micro-organismos, células de plantas e de animais (ALFONSI et al., 2008; BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005; YUNES).

3.2 Enzimas

Devido as suas ótimas propriedades funcionais como atividade catalítica, seletividade e especificidade, as enzimas são capazes de catalisar uma extensa gama de reações sob condições brandas, atendendo aos critérios de controle ambiental. A utilização de enzimas como catalisadores na indústria química apresenta algumas barreiras, como a solubilidade do biocatalisador, a baixa estabilidade e a forte inibição por substratos e produtos. Por causa destas características indesejadas algumas modificações devem ser feitas nas enzimas para melhorá-las e tornar sua aplicação industrial atrativa (GUISÁN, 2006).

As lipases estão entre as enzimas mais atrativas e promissoras para aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e oleoquímicas. No entanto, sua aplicação industrial ainda é limitada pelo alto custo e baixa estabilidade nas condições reacionais. A fim de minimizar esses inconvenientes e aumentar a vida útil do biocatalisador, algumas técnicas são empregadas, como a modificação química da enzima e a sua imobilização e a engenharia genética (VILLENEUVE et al., 2000).

3.2.1 Lipases

As lipases são produzidas por micro-organismos, plantas ou animais, sendo as microbianas as de maior interesse industrial e biotecnológico. As lipases microbianas apresentam uma série de vantagens quando comparadas às de origem animal ou vegetal sendo de destaque a facilidade de obtenção. As principais lipases utilizadas em sínteses orgânicas são as lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIR, 2007; ALGUIEIRAS; OLIVEIRA; FREIRE, 2015; NARWAL; GUPTA, 2013; RAVI et al., 2013).

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) pertencem a um grupo especial de esterases. São enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ligações éstercarboxílico na interface óleo/água, produzindo ácidos e álcoois orgânicos. São constituídas pela tríade catalítica G-X₁-S-X₂-G, em que G=glicina, S=serina, X₁= histidina e X₂=ácido aspártico ou glutâmico (FREIRE; CASTILHO, 2008).

Além da hidrólise, as lipases, em meios reacionais com restrição de água, podem catalisar reações reversas, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólises) e aminólise (DE CASTRO et al., 2004; VILLENEUVE et al, 2000).

A atividade lipolítica é baixa em soluções compostas somente de substratos lipídicos, mas aumenta significativamente quando são formadas interfaces lipídeos/água. Avanços da técnica de difração de raios X proporcionaram uma explicação para o fenômeno de ativação interfacial: o centro ativo dessas enzimas é recoberto por uma superfície hidrofóbica, denominada de "tampa" ou "lid", que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional expondo o sítio ativo (DE CASTRO et al., 2010; RODRIGUES, 2009).

As lipases, além de sua versatilidade de atuação, são quimio-regio e enantiosseletivas, características que inibem a formação de subprodutos, melhorando o rendimento dos processos (ADLERCREUTZ, 2013).

3.3 Lipases imobilizadas

As enzimas em sua forma livre apresentam dificuldade no processo de separação e de reciclo, além de apresentar elevado custo e atividade catalítica instável, influenciada facilmente por fatores como temperatura e pH. Estas limitações podem ser superadas por meio da sua imobilização, o que acarreta aumento na estabilidade e permite a fácil

separação do biocatalisador do meio e sua reutilização, diminuindo o custo do processo, além de conferir ao biocatalisador, resistência a temperatura, pH, etc (ZHANG et al., 2012).

Enzimas imobilizadas são definidas como: "enzimas fisicamente confinadas, ou localizadas em uma região específica, com retenção de suas atividades catalíticas e que podem ser utilizadas repetida e continuamente" (JEGANNATHAN et al., 2008).

A imobilização também torna possível sua utilização em processos contínuos o que apresenta como vantagens a facilidade de controle do processo, a diminuição no tempo de residência, a otimização do rendimento e o aumento da estabilidade do biocatalisador. Apresenta, porém, algumas desvantagens, como limitações de transferência de massa (GUISÁN, 2006).

Técnicas para a modificação de enzimas tem sido amplamente estudadas. As superfícies das lipases têm sido modificadas para introduzir aminoácidos que favorecem a interação com suportes sólidos ou que alteram o seu ponto isoelétrico. Estas modificações devem ser aplicadas com cuidado pois não devem alterar a estrutura do sítio ativo da enzima, o que pode interferir na sua atividade e estabilidade. As técnicas de modificação de enzimas podem ser classificadas em três categorias principais: modificação química, modificação física e engenharia genética (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VILLENEUVE et al., 2000).

O principal método de modificação de enzimas é a sua imobilização pela qual é possível alterar diversos parâmetros naturais da enzima. Além da estabilidade e atividade já mencionadas, é possível aumentar sua resistência a inibidores e alterar a especificidade e seletividade da enzima. Há a possibilidade também de imobilizar mais de uma lipase em um mesmo suporte, o que melhora sensivelmente o aproveitamento do derivado imobilizado, ampliando sua gama de aplicação. Uma ampla avaliação destas técnicas e uma visão geral destas modificações foram relatadas em uma revisão publicada por Rodrigues e colaboradores (2013).

Da mesma forma que tantos outros processos químicos e físicos são afetados por fatores externos, existem parâmetros que podem afetar o rendimento de imobilização, como, por exemplo, o método de imobilização utilizado, o tipo do suporte, o pH e a temperatura entre outros. Os grupos funcionais acessíveis na proteína é um dos principais fatores que afetam a ligação ao suporte (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005).

A ligação em suportes porosos insolúveis é o procedimento padrão mais utilizado tanto em escala laboratorial quanto industrial. Tal ligação por meio de adsorção física, metodologia de imobilização mais comum, depende das características hidrofílicas e hidrofóbicas das regiões superficiais, os grupos iônicos dominantes e suas interações são influenciados pelo pH do meio (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER; 2005).

Os melhores suportes para imobilização de lipases são os orgânicos, que apresentam maior afinidade com as lipases, incluindo polímeros sintéticos e naturais, como álcool polivinílico, quitosana, polihidroxibutirato, poliacrilonitrila, poliestireno, entre outros (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

3.4 Suportes para imobilização

A escolha do suporte para a imobilização deve ser realizada de acordo com a aplicação. Algumas características são comumente desejadas em um suporte para biocatálise em aplicação industrial como, por exemplo, alta resistência física e mecânica, resistência à contaminação, estabilidade térmica, disponibilidade e baixo custo. Os suportes podem ser classificados em orgânicos e inorgânicos de acordo com sua composição química. Entre os suportes orgânicos encontram-se os de natureza polímerica que podem ser subdivididos em naturais e sintéticos. Alguns exemplos de suportes utilizados na imobilização de enzimas encontram-se listados Tabela 1 (GUISÁN, 2006; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Certas características dos suportes, como a porosidade e o tamanho de partículas, determinam a área superficial total, um dos principais fatores que pode afetar a capacidade de ligação de enzimas ao suporte sólido. Materiais porosos são usualmente preferidos devido à alta área superficial que permite maior carregamento na imobilização e proteção ao ambiente externo, (GUISÁN, 2006).

			A .	
Or	gânicos	Inorgânicos		
Polímeros Naturais	Polímeros sintéticos	Minerais Naturais	Materiais processados	
Quitosana, alginato, colágeno, celulose, agar-agar, quitina, amido, albumina	Poliestireno, poliacrilatos, poliamidas, polipropileno, resinas epoxy	Sílica, bentonita, terra diatomácea, areia	Vidro, metais, óxidos metálicos, cerâmicas, alumino silicatos	

Tabela 1 - Suporte para imobilização de enzimas.

Fonte: Adaptado de GUISÁN, 2006; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; ZANIN; MORAES, 2004.

Dentre os suportes poliméricos para imobilização enzimática, uma opção que apresenta grande potencial de utilização é o poli(estireno-co-divinilbenzeno) que é objeto de diversos estudos de imobilização e de aplicação do derivado imobilizado (AYBASTIER; DEMIR, 2010; DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2008, 2009; HERNANDEZ; GARCIA-GALAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; HUANG et al., 2001; OLIVEIRA, 1999; OLIVEIRA et al., 2000; SANTOS et al, 2007; SANTOS; DE CASTRO, 2006). Sua forma estrutural juntamente com seus monômeros originais está representada na Figura 1.

Figura 1 – Esquema representativo da formação do Poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de Estireno e Divinilbenzeno



Fonte: Própria.

Outros suportes bastante estudados são os híbridos orgânico-inorgânicos, que apresentam características conjuntas dos dois tipos de materiais envolvidos. Entre estes materiais se encontra a classe dos compósitos magnéticos, que vem sendo utilizados em várias aplicações biotecnológicas, como na liberação controlada de fármacos, e apresentam ainda características importantes como área superficial específica alta, alta resistência térmica e facilidade de separação do meio reacional pela aplicação de um campo magnético externo (MEDEIROS et al., 2011; MURILLO et al., 2004; REBELO et al., 2010).

3.5 Polímeros e Técnicas de polimerização

Polímeros são macromoléculas compostas por muitas (poli) unidades de repetição (meros) ligadas entre si. Quando o polímero apresenta a cadeia principal formada por dois

meros diferentes, ele é chamado copolímero, como por exemplo, SBR, borracha sintética de estireno-butadieno. Os copolímeros mais importantes comercialmente são derivados de monômeros vinílicos, como estireno, cloreto de vinila, acrilonitrila e etileno (CARRAHER JUNIOR, 2010; FRIED, 2003). Existem diversas técnicas de síntese dos polímeros e de acordo com os materiais de partida elas se dividem em (CARRAHER JUNIOR, 2010; FRIED, 2003):

- Polimerização em Massa: Reação mais simples, contendo apenas monômero e iniciador. Apresenta como vantagem principal a qualidade do produto final, livre de qualquer impureza, porém possui difícil controle de temperatura durante a reação;
- Polimerização em Solução: Técnica que visa suprir a deficiência da técnica anterior, adicionando um líquido (solvente) ao meio para melhorar a transferência de calor e distribuição da temperatura;
- Polimerização em Suspensão: Com o objetivo de substituir o uso de solventes como meio de dispersão de calor, utiliza-se água. A adição de um agente de suspensão é necessária para estabilizar a dispersão do monômero em pequenas gotas evitando a sua coalescência. O produto final se apresenta na forma de pérolas;
- Polimerização em Emulsão: Nesta técnica um agente emulsificante é adicionado para manter o monômero disperso em água, formando micelas com extremidades hidrofóbicas viradas para dentro e hidrofílicas para fora. A polimerização ocorre dentro das micelas gerando um produto na forma de pó fino.

A técnica de polimerização em suspensão é utilizada para se obter esferas de polímeros e copolímeros e tem o agente de suspensão e a agitação como principais fatores para definição do tamanho e da forma do produto final. O agente de suspensão atua como estabilizante com a função de impedir a coalescência e quebra das gotas durante a polimerização. Normalmente é constituído por polímeros polares e atua diminuindo a tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água, além de formar uma fina camada sobre as gotas protegendo-as da coalescência nos momentos de colisão. O poli(álcool vinílico) (PVA) é um dos estabilizantes mais utilizados em polimerização em suspensão (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

3.6 Compósitos magnéticos

Compósitos magnéticos têm sido objeto de estudos devido a sua larga aplicação em diferentes campos da química, física, biologia e medicina. A imobilização de lipases em partículas magnéticas se destaca nestes estudos, uma vez que estes materiais apresentam elevada área superficial, alta resistência a temperatura e fácil separação (DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012; SOUZA, 2013). Diversos trabalhos apresentaram sucesso nos resultados de imobilização de lipases empregando esta classe de suporte (ABD-ELHAKEEM; ELSAYED; ALKHULAQI, 2014; LIU et al., 2006; TRAN; CHEN; CHANG, 2012; WU et al., 2009; ZENG; LUO; GONG, 2006).

Os compósitos magnéticos são compostos basicamente por uma matriz polimérica e cargas magnéticas, geralmente obtidas da magnetita (Fe₃O₄), que apresenta forte propriedade magnética e baixa toxicidade, além de fácil obtenção. A magnetita é um material ferromagnético contendo íons de ferro nos estados de oxidação 2^+ e 3^+ , obtida por diversas técnicas como a decomposição térmica, a microemulsão e a co-precipitação, sendo esta última a mais difundida devido à simplicidade e baixo custo. Esta técnica consiste na preparação de uma solução aquosa de íons Fe²⁺ e Fe³⁺ e uma solução básica, gerando as nanopartículas de óxido de ferro, conforme esquematizado na Equação 1 (BARRETO et al., 2012; BRUNO et al., 2005; LAURENT et al., 2008; SOUZA, 2013).

$$Fe^{2+} + 2 Fe^{3+} + 8 OH^{-} \rightarrow Fe_{3}O_{4+} 4 H_{2}O$$
 (1)

3.7 Partículas magnéticas e suas propriedades

O estudo de partículas magnéticas, principalmente as compostas por óxidos de ferro, tem atraído interesse em diversas áreas devido as suas diversas características, como biocompatibilidade, pequeno tamanho (escala nanométrica), superparamagnetismo, baixa toxicidade, elevada área superficial, fácil separação do meio, entre outras. Suas aplicações incluem os campos da física, medicina e catálise (REN et al., 2011).

O magnetismo de materiais, fenômeno relacionado às forças de atração e repulsão, possui estudos datados desde a Grécia antiga, tendo apresentado destaque após a descoberta da eletricidade no século XIX (GUIMARÃES, 2005). As propriedades magnéticas de um material são devidas ao momento magnético dos elétrons de seus átomos (CULLITY; GRAHAN, 2009).

Os óxidos de ferro são partículas ferromagnéticas e apresentam características de baixa retentividade e relutância, ou seja, são fortemente atraídos por um campo magnético porém não retém a magnetização após a retirada do campo magnético, não gerando aglomerados e podendo assim ser facilmente dispersos. Por conta desta propriedade, são materiais considerados superparamagnéticos, o que pode ser verificado pela curva de histerese do material (MEDEIROS, 2010; CAMILO, 2006; TERRIS; THOMSON, 2005).

A magnetita é o principal óxido de ferro utilizado em aplicações biotecnológicas, porém devido a oxidação durante a síntese, as partículas magnéticas são constituídas por magnetita (Fe₃O₄) e maghemita (γ Fe₂O₃), sendo a magnetita facilmente oxidada à maghemita por exposição ao oxigênio ou agentes oxidantes. Apesar da estrutura semelhante, a maghemita apresenta magnetização de saturação ligeiramente menor (THOREK et al., 2006; YAMAURA et al., 2004).

A primeira aplicação de partículas magnéticas na imobilização de enzimas data da década 70 (ROBINSON et al., 1973), e indicou a eficiência da utilização de derivados magnetizados na separação do meio reacional.. Além de apresentar a facilidade de separação do meio reacional, facilitando a reutilização do biocatalisador, outra vantagem de um biocatalisador magnetizado seria sua aplicação em reatores de fluxo contínuo utilizando leito fluidizado pela aplicação de campo magnético externo (BRUNO; LIMA FILHO; DE CASTRO, 2008).

3.8 Técnicas de Imobilização

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método mais adequado para as enzimas. Portanto, para cada aplicação é necessário escolher o procedimento mais simples e de menor custo que resulte em uma enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VILLENEUVE et al., 2000). As principais vantagens e desvantagens dos métodos de imobilização mais utilizados são mostradas na Tabela 2.

Dentre as diversas técnicas de imobilização, as mais aplicadas aos suportes híbridos, magnéticos ou não, são as técnicas de adsorção física e de ligação covalente. A Tabela 3 apresenta alguns estudos que utilizaram lipases imobilizadas em suportes a base de STY-DVB e de partículas magnéticas, indicando a lipase, o suporte e o método de imobilização utilizado.

3.8.1 Adsorção física

Dentre os diversos métodos de imobilização, o mais comumente utilizado é o método de adsorção física. Neste método a lipase é imobilizada através de interações reversíveis com o suporte, tornando possível o reaproveitamento do suporte após a perda de atividade do derivado imobilizado. As interações envolvidas são geralmente forças de Van der Waals, ligações iônicas, pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; JEGANNATHAN, 2008; ZANIN; MORAES, 2004).

Em geral a adsorção de lipases em suportes ocorre na superfície, por isso parâmetros como tamanho da lipase, área superficial do suporte e principalmente o tamanho dos poros do material, influenciam fortemente na eficiência do método de imobilização. A porosidade é importante devido ao fato de que a enzima não irá se ligar somente na superfície do suporte como também dentro dos poros (ADLERCREUTZ, 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; VILLENEUVE et al., 2000).

Método	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Simplicidade, pouca ou nenhuma mudança na conformação da enzima	Ligação fraca podendo levar à dessorção da enzima
Ligação Covalente	Ligação estável entre enzima e suporte	Preparação difícil, de alto custo e impossível regeneração do suporte
Ligação Cruzada	Enzimas fortemente ligadas	Perda de atividade durante a preparação, impossível regeneração do suporte e alto custo
Aprisionamento e Encapsulação	Enzima não interage quimicamente com o suporte	Limitações de transferência de massa

Tabela 2- Técnicas de imobilização de enzimas.

Fonte: Adaptado de DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VILLENEUVE et al., 2000.

Para que a imobilização via adsorção ocorra com sucesso é necessário que haja afinidade entre a enzima e o suporte escolhido sendo a afinidade dependente das interações que surgem entre certos grupos ativos específicos no suporte e na enzima. Caso não ocorram interações naturalmente pela composição, é possível obtê-las através da aplicação de agentes intermediários, os modificadores de suporte (ADLERCREUTZ, 2013; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; VILLENEUVE et al., 2000).

Este método é vantajoso em diversas situações devido a sua simplicidade, porém a sua principal desvantagem é a facilidade de ocorrência do fenômeno de dessorção, onde a lipase se desprende do suporte. Todavia, sob certas condições reacionais, como meio orgânico, este método mostra-se bastante eficiente, pois a enzima é insolúvel em meio apolar, não precisando, portanto, de fortes ligações para impedir a dessorção (ADLERCREUTZ, 2013; VILLENEUVE et al., 2000).

Como as ligações envolvidas são de natureza fraca, elas não afetam a estrutura natural da enzima, não alterando o sítio ativo, o que permite uma retenção máxima da atividade enzimática (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Alguns trabalhos utilizaram com sucesso este método de imobilização em partículas esféricas de STY-DVB, um suporte altamente hidrofóbico, favorecendo a formação de interações entre o suporte e a lipase acarretando na adsorção hidrofóbica. Oliveira et al. (2000) utilizou como biocatalisador a lipase de *Candida rugosa* imobilizada. Seus resultados mostraram aumento na estabilidade térmica da enzima, boa atividade de hidrólise e de esterificação.

Santos et al. (2007) também utilizaram este derivado imobilizado e conseguiram resultados promissores. Os autores mostraram que a lipase utilizada apresentou preferência por ácidos graxos de 12 carbonos na esterificação quando imobilizada neste suporte. Hernandez, Garcia-Galan e Fernandez-Lafuente (2011) utilizaram este material como suporte para imobilização de lipase B de *Candida antarctica* e obtiveram resultados com uma grande carga enzimática imobilizada, apresentando alta atividade catalítica e altos valores de tempo de meia vida quando comparados com a mesma enzima imobilizada em outros suportes.

Lipase	Suporte	Método de Imobilização	Referência	
		modinzaçao		
Candida antarctica	Poli(estireno-co- divinilbenzeno)	Adsorção Física	Hernandez; Garcia- Galan; Fernandez- Lafuente, 2011	
Candida rugosa	Poli(estireno-co- divinilbenzeno)	Adsorção Física	Santos; de Castro, 2006	
Candida rugosa	Poli(estireno-co- divinilbenzeno)	Adsorção Física	Santos et al., 2007	
Candida rugosa	Poli(estireno-co- divinilbenzeno)	Adsorção Física	Oliveira et al., 2000	
ThermomycesPoli(estireno-co- divinilbenzeno)Ligação Covalen		Ligação Covalente	Dizge; Keskinler; Tanriseven, 2008	
Thermomyces lanuginosus	Poli(estireno-co- divinilbenzeno-co- glutaraldeido)	Ligação Covalente	Aybastier; Demir, 2010	
Candida cylindracea	Poli(acetato de vinila- co-divinilbenzeno) magnetizado (Fe ₃ O ₄)	Adsorção Física	Guo; Bai; Sun, 2003	
Candida rugosa	Fe3O4-Quitosana	Adsorção Física	Xie; Wang, 2012	
Candida rugosa	Fe3O4-Quitosana	Ligação Covalente	Wu et al., 2009	
Candida rugosa, Mucor miehei	Fe ₃ O ₄ -POS-PVA	Ligação Covalente	Bruno; Lima Filho; de Castro, 2008	
Mucor miehei	Fe ₃ O ₄ -POS-PVA	Ligação Covalente	Bruno et al., 2004	
Burkholderia sp.	Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Adsorção Física	Liu et al., 2012	
Burkholderia cepacia	Fe ₃ O ₄ -SiO ₂	Adsorção Física	Tran et al., 2012	

Tabela 3 - Estudos de lipases imobilizadas em poli(estireno-co-divinilbenzeno) e em suportes magnéticos.

Fonte: Própria.

3.8.2 Imobilização por ligação covalente

O método de imobilização por ligação covalente consiste em formar uma ligação covalente entre os grupos funcionais da enzima e os grupos reativos existentes no suporte ativado, em posições que não limitem o mecanismo de catálise. Uma das principais vantagens deste método é a natureza estável da ligação covalente. A enzima não é

facilmente liberada, portanto o fenômeno de dessorção é minimizado. Esta técnica é vantajosa quando o produto deve ser totalmente isento de enzima, que está fortemente ligada ao suporte e, portanto, não "contamina" o produto final, gerando economia em processos de separação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; GUISÁN, 2006; VILLENEUVE et al., 2000).

Muitos tipos de suportes podem ser utilizados para imobilização por este método, sejam eles orgânicos ou minerais, porém precisam ser previamente ativados. A ativação corresponde à inclusão de um grupo químico capaz de reagir com os grupamentos laterais das enzimas. Existem diferentes métodos de ativação, porém o mais comum é o uso de glutaraldeído (VILLENEUVE et al., 2000).

Os processos de ativação geralmente buscam gerar grupos eletrofílicos no suporte, para reagir com os fortes nucleófilos das enzimas. Na imobilização por ligação covalente, existem diversos grupos funcionais que apresentam características que os tornam elegíveis para utilização, porém na prática apenas alguns deles são escolhidos. As reações do processo frequentemente envolvem as cadeias laterais dos aminoácidos lisina, arginina, cisteína e ácidos aspártico e glutâmico (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2005; GUISÁN, 2006).

Mesmo com preparação rigorosa e cuidadosa, a enzima pode perder parte de sua atividade durante a imobilização o que é uma desvantagem do método além da toxidade de diversos agentes de ativação (ZHANG et al., 2012).

Os trabalhos publicados por Dizge, Keskinler e Tanrisever (2008, 2009) relatam que a lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada com sucesso utilizando o método de ligação covalente em suporte de STY-DVB ativado com glutaraldeído. Aybastier e Demir (2010) utilizaram este mesmo derivado imobilizado e estudaram a influência dos diversos fatores envolvidos no método de imobilização.

3.8.3 Aprisionamento e microencapsulação

Um outro método de imobilização física é a inclusão (ou aprisionamento) da enzima em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula que permita a passagem de substrato e produto, sem liberar a enzima. Neste caso a lipase é polimerizada junto com os monômeros, ficando retida dentro do polímero. As matrizes mais utilizadas são poliacrilamida gel e o alginato (GUISAN, 2006; VILLENEUVE et al., 2000; ZHANG et al., 2012).

Uma subcategoria do método de aprisionamento é a técnica de microencapsulação, que segue o mesmo princípio, porém neste caso a enzima é imobilizada juntamente com todo seu microambiente. São criadas células artificiais delimitadas por uma membrana capaz de permitir a passagem de moléculas pequenas como substratos e produtos e reter moléculas maiores como as enzimas (VILLENEUVE et al., 2000).

A principal limitação deste método está relacionada aos parâmetros de transferência de massa envolvidos na membrana ou gel, que precisam de uma taxa de difusão eficiente. Por este motivo este método é melhor aplicado para substratos constituídos de moléculas menores e geralmente altas concentrações são necessárias para suprir esta limitação. Uma das vantagens deste método se deve ao fato da enzima não interagir quimicamente com o suporte, evitando sua desnaturação. Outros pontos favoráveis na escolha desta técnica incluem os fatos de ser um método de baixo custo, rápido e que geralmente envolve condições brandas. Este método é o menos estudado e o menos desenvolvido. (ADLERCREUTZ, 2013; GUISAN, 2006; VILLENEUVE et al., 2000; ZHANG et al., 2012).

3.8.4 Ligação cruzada

O método de ligação cruzada (*cross-linking*) consiste em uma rede estrutural tridimensional entre as interações da enzima, suporte e agente de ligação. As moléculas de lipase se ligam entre si através de vários reagentes bifuncionais. Este método forma ligações intensas que diminuem a atividade do catalisador. As preparações via ligação cruzada possuem a enzima como principal constituinte, mas este método também é utilizado em combinação com outros tipos de imobilização, como adsorção (VILLENEUVE et al, 2000; ZHANG et al., 2012).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Materiais para a síntese dos suportes

Na síntese do copolímero foram utilizados como monômeros: estireno (Sigma-Aldrich[®]) e divinilbenzeno (Sigma-Aldrich[®]); como solventes: heptano (Cromoline) e toluol (Cromoline) e como iniciador: azobisisobutironitrila (AIBN) (MIG Química). Na síntese do copolímero magnetizado foi utilizada magnetita obtida por co-preciptação a partir de cloreto de ferro (III) Sigma-Aldrich[®] > 97% e cloreto de ferro (II) tetra-hidratado, Sigma-Aldrich[®], 99%. Como agentes de suspensão foram utilizados o álcool polivinílico (PVA) 99% hidrolisado – MM 89000-98000, Sigma-Aldrich[®] e PVA 88% hidrolisado – MM 78000, Polysciences, Inc.

4.1.2 Enzimas

Os experimentos foram realizados utilizando as preparações comerciais de lipase microbiana de *Candida rugosa* tipo VII e lipase de *Brukholderia cepacia* (Amano PS), adquiridas da Sigma-Aldrich[®].

4.1.3 Demais reagentes

Outros reagentes utilizados incluíram: etanol anidro (Cromoline), etanol 96% (Cromoline), acetona (Cromoline), hidróxido de sódio (Cromoline), hidróxido de potássio (Synth), ácido butírico (Vetec), n-butanol (Merck), ácido oleico (Cromoline), acetato de etila (Cromoline), polietileno glicol (MM 1500, Synth), goma arábica em pó pura (Synth), óleo de oliva comercial com baixo teor de acidez (Carbonell) e óleo de coco comercial (Frescoco).

4.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho estão apresentados na Tabela 4.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/Fabricante	
Medidas de pH	Potenciômetro	TEC2, Tecnal (TECNAL)	
Toor de umidade	Balança	ID 50, Marte (Marte Balanças e	
Teor de unidade	analítica	Aparelhos de Precisão Ltda)	
Dosagam da ástaras	Cromatógrafo	GC-3800 - Varian (Agilent	
Dosagem de esteres	de fase gasosa	Technologies)	
Microscopia Eletrôpica de	Microscópio		
Varredura	Eletrônico de	LEO1450VP	
	Varredura		
Difração de Rajos-X	Difratômetro	XRD 6000 - Shimadzu	
Dillação de Kalos-2X	de Raios-X	AND 0000 Shiniadzu	
Espectroscopia na região do			
Infravermelho por Transformada	Espectrômetro	GX – Perkin Elmer	
de Fourier			
Agitação	Agitador	RW20-Digital,	
	Mecânico	IKA (IKA Laboratory	
	meeumeo	Equipaments)	

Tabela 4 - Principais equipamentos utilizados na realização do trabalho.

Fonte: Própria.

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Purificação do AIBN

O iniciador das reações de polimerização, AIBN, foi purificado via recristalização. Em um erlenmeyer, 5 g de AIBN foram totalmente solubilizados em 100 mL de metanol sob agitação magnética e em seguida a solução foi mantida a 4 °C por 24 h. Os cristais foram filtrados e secos em dessecador utilizando sílica gel como agente desumidificante.

4.3.2 Síntese do suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno)

O suporte de STY-DVB foi sintetizado pela técnica de polimerização em suspensão utilizando os monômeros de estireno e divinilbenzeno, toluol e heptano como bom solvente e mau solvente, respectivamente (COUTINHO; CUNHA; GOMES, 2004), AIBN como iniciador e solução aquosa de álcool polivinílico (PVA) como agente de suspensão.

Foram estudados dois agentes de suspensão: PVA grau de hidrólise 99% (MM 89000-98000) e PVA grau de hidrólise 88% hidrolisado (MM 78000) ambos em 3 concentrações diferentes (0,5 %; 1,0 %; 2,0 % m v⁻¹). As soluções foram preparadas utilizando água ultra-pura (UP) sob agitação magnética durante 18 h.

As reações foram realizadas em balão de fundo redondo de 3 bocas acoplado com condensador de refluxo a 16 °C sob atmosfera inerte (Argônio ou Nitrogênio) como ilustrado na Figura 2. A velocidade de agitação ideal foi definida variando seus valores entre 100 rpm e 500 rpm de modo a obter o tamanho desejado das partículas de copolímero. A fase orgânica foi preparada previamente, sob atmosfera inerte, misturando-se os monômeros e em seguida o iniciador AIBN. Após a total solubilização do iniciador foram adicionados o mau e o bom solvente, nesta ordem. A fase orgânica foi então vertida sobre a fase aquosa (solução do agente de suspensão) e a reação foi mantida a 70 °C sob agitação mecânica durante 24 h. As quantidades utilizadas de cada componente estão detalhadas na Tabela 5.

Após as 24h de reação, o produto formado foi filtrado e lavado exaustivamente com água UP à temperatura ambiente e água UP aquecida na temperatura entre 40-50 °C, acetona e etanol, para remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C por 18 h.





Banho de Resfriamento

Fonte: Própria

Reagente	Massa
Estireno	7,81 g
Divinilbenzeno	7,81 g
AIBN	0,2768 g
Heptano	17,18 g
Toluol	17,18 g
Agente de suspensão	208, 19 g

Tabela 5- Formulação utilizada nas reações de polimerização.

Fonte: Própria.

4.3.3 Síntese do suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado com magnetita (Fe₃O₄)

O suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com magnetita (STY-DVB magnetizado) foi sintetizado utilizando a mesmas condições da polimerização descrita no item 4.3.2, com adição das partículas magnéticas.

Com o objetivo de selecional a melhor maneira para a incorporação destas partículas ao polímero, foram testadas 3 metodologias:

- Adição do fluido férrico formado na co-preciptação diretamente no meio reacional de polimerização;
- 2- Adição das partículas de magnetita na forma seca ao meio reacional;
- 3- Adição de partículas de magnetita seca com a superfície modificada por meio de tratamento prévio com ácido oleico.

As partículas de magnetita (Fe_3O_4) foram adicionadas à polimerização na quantidade correspondente a 10% da massa dos monômeros.

4.3.4 Síntese da Magnetita: Co-Preciptação dos ions Fe⁺² e Fe⁺³

Uma solução aquosa de FeCl₂ 0,6 mol L⁻¹ e uma solução aquosa de FeCl₃.4H₂O 1,1 mol L⁻¹, foram misturadas lentamente, em um béquer imerso em banho de glicerina, sob vigorosa agitação mecânica. A temperatura do meio reacional foi ajustada e estabilizada a 65 °C e solução aquosa de NaOH 4 mol L⁻¹ foi adicionada lentamente ao meio, até atingir pH 11,0. A agitação mecânica foi ajustada durante a adição da solução básica em função do aumento da viscosidade do meio no decorrer da reação.
A solução de coloração negra formada foi mantida sob agitação por 30 min a 65 °C seguido de repouso sobre um imã (campo magnético externo) para auxiliar a decantação das partículas magnéticas precipitadas na reação. A massa negra decantada foi separada e lavada sucessivamente com água UP e solução 1:1 de acetato de etila e água UP até que o sobrenadante atingisse o pH 7,0. O fluido férrico contendo as partículas magnéticas foi filtrado a vácuo e levado à estufa a 60 °C por 18 h. Após a secagem, o composto obtido foi triturado com auxílio de graal e pistilo. Um fluxograma simplificado do processo pode ser visualizado na Figura 3.





Fonte: Própria.

4.3.5 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico

De modo a facilitar a incorporação das partículas magnéticas ao polímero, foi realizada a modificação da superfície da magnetita utilizando ácido oleico, para aumentar sua afinidade hidrofóbica e facilitar a dispersão na fase orgânica, preferencialmente à fase aquosa. Para esta finalidade foi utilizada como base a metodologia descrita por Lee, Rho e Jung (2003).

Inicialmente a magnetita seca foi misturada sob forte agitação em ácido oleico na proporção de 1:13 (m/v) de ácido oleico:magnetita, proporção esta definida em trabalhos anteriores (VAN EWIJK; VROEGE; PHILIPSE, 1999). Em seguida foram adicionados 25 mL de água para cada 1 g de partículas magnéticas e a mistura permaneceu sob forte

agitação por 30 min. A emulsão formada foi filtrada a vácuo e lavada com etanol para remover o ácido oleico residual. As partículas magnéticas modificadas foram levadas à estufa a 60 °C por 18h para completa secagem. As etapas do processo estão ilustradas de forma resumida no fluxograma da Figura 4.

Figura 4 - Etapas da modificação da superfície da magnetita com ácido oleico.



Fonte: Própria.

Para verificar se a modificação foi bem sucedida, foram realizados dois testes adicionando-se 0,5 g das partículas modificadas em misturas 1:1 de meio orgânico:aquoso (heptano:água e estireno:água) para observar o comportamento da magnetita.

4.3.6 Imobilização das lipases de *Candida rugosa* (LCR) e de *Burkholderia cepacia* (LPS)

Os suportes sintetizados, STY-DVB e STY-DVB magnetizado, foram embebidos em heptano em uma proporção de 1:10 (m/v) e mantidos sob agitação por 2 h em *shaker*. Após este período foi adicionado 100 μ L de solução aquosa 5 g L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG-1500) e 0,25 g de lipase, para cada 1 g de suporte. A suspensão contendo enzima, suporte e PEG-1500 foi homogeneizada por suave agitação com bastão de vidro até visível adesão da enzima ao suporte, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4°C.

A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo com lavagens sucessivas com heptano até a redução da umidade para valores inferiores a 15%. As atividades hidrolíticas dos derivados imobilizados foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999) e o rendimento de imobilização (η %) foi calculado utilizando a Equação 2.

$$\eta(\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100$$
(2)

Em que U_0 = unidades de atividade oferecidas para imobilização; Us = unidades de atividade enzimática total presentes no derivado imobilizado (massa seca do derivado imobilizado x atividade).

4.3.7 Síntese do éster butirato de n-butila

A lipase de *Candida* rugosa livre e imobilizada nos dois suportes foi aplicada na reação de esterificação do ácido butírico com n-butanol diluídos em meio heptano. O substrato da reação foi preparado contendo solução de ácido butírico 0,125 mol L^{-1} e n-butanol 0,10 mol L^{-1} em meio heptano. A reação utilizou 20 mL do substrato e 0,5 g de derivado imobilizado ou 0,1 g da lipase livre como biocatalisador. As reações foram realizadas em *shaker* sob agitação de 150 rpm a 40 °C por 24 h.

O consumo do ácido na reação foi acompanhado por titulação e o consumo do álcool e a formação do produto (butirato de n-butila) foram acompanhados por Cromatografia em Fase Gasosa.

4.3.8 Síntese dos ésteres alquílicos via transesterificação enzimática

A lipase PS de *Burkholderia cepacia* imobilizada no suporte de STY-DVB magnetizado foi aplicada em reações de transesterificação. As reações foram efetuadas em balões esféricos de três bocas (capacidade de 125 ml), acoplados com condensador de refluxo, sob agitação mecânica de aproximadamente 150 rpm. As sínteses foram realizadas numa temperatura fixa de 45 °C, com 20 g de meio reacional composto por óleo de coco e etanol numa razão molar de 1:6, em meio isento de solvente, e 20% em massa de lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em STY-DVB magnetizado. Os produtos formados foram quantificados por cromatografia em fase gasosa. O rendimento de transesterificação foi calculado de acordo com a metodologia descrita previamente por Urioste et al. (2008).

4.4 Métodos de Análise

4.4.1 Dosagem de umidade

A determinação do teor de umidade dos biocatalisadores foi feita em balança analítica acoplada com infravermelho (ID 50, Marte) durante 15 min a 105 °C.

4.4.2 Análise de área superficial (B.E.T.)

Os valores de área superficial específica dos suportes estudados foram obtidos pelo método B.E.T. (Brunauer, Emmett e Teller, 1938) empregando a técnica de adsorção dessorção física de nitrogênio a 77,3 K. As amostras foram previamente submetidas a aquecimento de 100 °C por 3 horas sob vácuo. As análises foram realizadas no Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, Cachoeira Paulista – SP).

4.4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As características morfológicas dos suportes STY-DVB e STY-DVB magnetizado antes e depois da imobilização da lipase de *Candida rugosa* foram analisadas e comparadas utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias da superfície dos suportes foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP com EDS acoplado (Schott Zeiss do Brasil, SP, Brasil).

4.4.4 Difração de Raios-X (DRX)

Os suportes sintetizados de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e não magnetizado foram analisados por medidas de difração de raios-X para identificação estrutural dos materiais. As análises foram realizadas em um difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD 6000, utilizando a técnica de difratometria de pó, a uma tensão de 40 kV e corrente de 30 mA. As análises foram efetuadas em intervalos angulares de 10 a 70 graus e tempo de contagem de 1 segundo. A radiação utilizada foi de CuKα com monocromador de grafite e comprimento de onda de 1,5418 Å.

4.4.5 Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de magnetita e dos suportes magnetizado e não magnetizado foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier para caracterizar a composição do material. As análises foram conduzidas em espectrômetro de modelo Spectrum GX (Perkin Elmer) empregando o método de transmissão na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm⁻¹ usando cristais de KBr, sendo medidos os valores de absorbância. Foram feitas 32 varreduras com resolução de 4 cm⁻¹. As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, utilizando-se cerca de 2 mg da amostra seca e 20 mg de KBr.

4.4.6 Análise de magnetização (curva de histerese)

As partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado foram analisadas em um Magnetômetro de Amostra Vibrante (VSM) modelo PAR4500, utilizando aproximadamente 0,02 g de amostra durante 32 minutos de análise sob temperatura ambiente. O campo magnético aplicado foi de: 5,0<|H|<20,0 kOe, em 3,0 minutos; 0,5<|H|<5,0 kOe, em 2,5 minutos e |H|<0,5 kOe em 5,0 minutos. A análise utilizou 10 pontos por minuto para a obtenção dos dados. A análise foi realizada no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (São Paulo – SP).

4.4.7 Determinação de atividade enzimática

As atividades enzimáticas das lipases livres (LCR e LPS) e imobilizadas nos suportes de STY-DVB e STY-DVB magnetizado foram determinadas pelo do método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de KOH 0,02 mol L⁻¹ utilizando fenolftaleína como indicador.

Os cálculos foram realizados pela Equação 3 e uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio (37 °C, 5 min). As atividades foram expressas em unidades de atividade por grama de lipase ou de derivado imobilizado (U g⁻¹).

Atividade (U g⁻¹) =
$$\frac{(V_a - V_b).C.1000}{t.m}$$
 (3)

Em que: V_a = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL); C = Concentração da solução aquosa de KOH utilizada na titulação (mol L⁻¹); t = tempo da reação em minutos; m = massa de enzima livre ou imobilizada utilizada (g).

4.4.8 Caracterização das propriedades bioquímicas dos biocatalisadores

A influência do pH e da temperatura nas atividades hidrolíticas das lipases livres e imobilizadas foi avaliada segundo um planejamento experimental 2² estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central. Os níveis reais e codificados das variáveis estudadas estão apresentados na Tabela 6. A Tabela 7 mostra todos os experimentos realizados, ressaltando-se que estes foram efetuados de maneira randômica.

Variáveis		Níveis				
Reais	Codificadas	-α (-1,414)	-1	0	1	+α (1,414)
Temperatura (°C)	А	31	35	45	55	59
рН	В	5,6	6,0	7,0	8,0	8,4

Tabela 6 - Níveis reais e codificados para as variáveis pH e temperatura avaliados utilizando planejamento experimental.

Fonte: Própria.

EXPERIMENTOS	pН	Temperatura	рН	Temperatura
1	6	35	-1	-1
2	8	35	1	-1
3	6	55	-1	1
4	8	55	1	1
5	7	45	0	0
6	5,6	45	-1,414	0
7	8,4	45	1,414	0
8	7	31	0	-1,414
9	7	59	0	1,414
10	7	45	0	0
11	7	45	0	0

Tabela 7 - Planejamento experimental utilizado na análise da influência de pH e temperatura.

Fonte: Própria.

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL , sendo adicionados: 5 mL de substrato (preparado pela emulsão de azeite de oliva com solução de goma arábica a 7%), 4 mL de solução tampão fosfato de sódio (0,1 mol L⁻¹, com pH variável (5,6; 6,0; 7,0; 8,0 e 8,4) e 1 mL de solução aquosa enzimática (0,5 mg mL⁻¹), para enzima livre, ou 0,05g do derivado imobilizado. Os frascos foram incubados em temperaturas variadas (31, 35, 45, 55 e 59 °C) por 5 min, em *shaker* termostatizado com agitação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição de 10 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1). Os dados obtidos foram analisados com auxílio dos

softwares Statistica versão 12 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 9.0 (Stat-Ease Corporation, USA).

4.4.9 Caracterização das propriedades cinéticas das lipases livres e imobilizadas

Os parâmetros cinéticos das lipases livres (LCR e LPS) e imobilizadas nos suportes STY-DVB e STY-DVB magnetizado foram determinadas tomando por base o modelo cinético de Michaellis-Menten, utilizando o método de Lineweaver-Burke, em relação à reação de hidrólise do azeite de oliva. Os cálculos foram realizados utilizando o *software* Hyper 32.

Foram preparadas emulsões com diferentes proporções de azeite de oliva (10 – 60%) e solução aquosa de goma arábica (7% m v⁻¹). No meio reacional a concentração de ácidos graxos totais variou entre $0 - 2240 \text{ mmol L}^{-1}$, como indicado na Tabela 8.

Concentração de substrato (%)	Concentração de substrato (mmol L ⁻¹)
0	0
10	372
20	744
30	1116
40	1488
50	1860
60	2232

Tabela 8 - Variação nas concentrações do substrato.

Fonte: Própria.

4.4.10 Caracterização da estabilidade térmica dos biocatalisadores

A estabilidade térmica das lipases livres e imobilizadas nos dois suportes sintetizados foi estudada pela quantificação da atividade hidrolítica residual após incubação dos biocatalisadores em meio heptano a 60 °C por até 180 min, com quantificação da atividade de hidrólise do azeite de oliva em intervalos de tempo prédeterminados entre 15 e 180 min.

Os coeficientes de desativação térmica (Kd) e tempos de meia-vida $(t_{1/2})$ foram calculados a partir das Equações 4 e 5.

$$\ln A = \ln A_0 - kd \times t \tag{4}$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{ln2}{kd} \tag{5}$$

Em que: A_0 = atividade inicial e A = atividade residual.

4.4.11 Influência da razão molar e concentração dos reagentes na síntese do butirato de n-butila catalisada pelo derivado imobilizado magnetizado

Para verificar a influência de alguns fatores na reação de esterificação do butirato de butila catalisada por lipase de Candida rugosa imobilizada em poli(estireno-codivinilbenzeno) magnetizado, foi realizado um planejamento experimental simples 2² com duplicata no ponto central variando a razão molar ácido: álcool e a concentração total dos reagentes no substrato em relação ao solvente (heptano), as variáveis e os níveis utilizados estão indicados na Tabela 9. Os experimentos realizados estão indicados na Tabela 10.

Variáveis		Níveis	
	(-)	0	(+)
Razão Molar (ácido:álcool)	1:1	2:1	3:1
Concentração total em relação ao solvente	$400 \text{ mmol } \text{L}^{-1}$	$1200 \text{ mmol } \text{L}^{-1}$	2000 mmol L^{-1}
Fonte: Própria			

Tabela 9- Variáveis e níveis utilizados no planejamento experimental para a esterificação do Butirato de n-Butila

Fonte: Propria.

Tabela 10 - Substratos preparados a partir do planejamento experimental

	Níveis o	los Fatores
Experimentos	Razão Molar	Concentração Total
S0	0	0
S0 repetição	0	0
S1	-	-
S2	+	-
S3	-	+
S4	+	+

Fonte: Própria.

4.4.12 Acompanhamento das reações de esterificação

O consumo do ácido na reação foi acompanhado por titulação com solução aquosa de KOH e fenolftaleína como indicador, adicionando 10 mL de etanol às alíquotas de 0,5 g do meio reacional. O consumo do álcool e a formação do produto (butirato de butila) foram acompanhados por Cromatografia em Fase Gasosa.

O consumo do álcool e a formação do produto (butirato de n-butila) foi acompanhado por Cromatografia em fase gasosa empregando cromatógrafo a gás (Modelo Varian CG 3800) equipado com detector de ionização de chama e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6ft 2.0 mm ID e 1/8''OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil). Nitrogênio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 25 mL min⁻¹. A coluna foi submetida a uma rampa de aquecimento: 60 °C por 3 min até 75 °C numa taxa de 15 °C min⁻¹, mantendo constante por 3 min e 75 °C até 150 °C numa taxa de 20 °C min⁻¹, mantendo-se constante por 1,25 min; totalizando 12 min de análise. Para coleta dos dados foi utilizado o *software* Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O volume de injeção foi de 1µL de uma mistura 1:1 da amostra com o padrão interno (hexanol).

5. RESULTADOS-E DISCUSSÕES

5.1 Condições reacionais de síntese do copolímero STY-DVB

As condições estudadas na reação de copolimerização de estireno e divinilbenzeno mostraram que o polímero obtido apresentou maior uniformidade de tamanho e forma quando o agente de suspensão utilizado foi PVA grau de hidrólise 88% e massa molar média de 78000 na concentração de 1% m/m em meio aquoso e velocidade de agitação de 230 rpm. Na Figura 5 pode ser observado o polímero obtido em imagens sem ampliação (a) e ampliado por microscopia óptica (b e c), sendo possível notar a forma esférica das partículas e sua uniformidade.

Figura 5- Imagens do copolímero STY-DVB; a) Sem ampliação; b) Ampliação de 50 x em microscópio óptico; c) Ampliação de 100 x em microscópio óptico.



Fonte: Própria.

A velocidade de agitação mostrou ser um fator determinante no tamanho das partículas formadas, assim como na estabilização da reação, evitando grandes aglomerados. Foi verificado que, conforme dados da literatura, o diâmetro das partículas é inversamente proporcional à velocidade de agitação. (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

Outro fator estudado que demonstrou ser determinante na estabilidade do processo foi a solução aquosa de PVA como agente de suspensão. Os resultados, assim como os encontrados na literatura, mostram que PVA com alto grau de hidrólise não é adequado como agente estabilizante nestas reações, pois demonstram característica hidrofílica maior e difundem mais lentamente para a interface orgânica/inorgânica. Altas concentrações do agente também não são adequadas, visto que a solução atinge um grau de saturação na difusão para a interface (BAO et al., 2003). O produto obtido utilizando PVA com 99% de grau de hidrólise se apresentou na forma de pó e de aglomerados, não apresentando uniformidade nem forma característica. Dessa forma, para a continuidade do trabalho, a síntese do polímero foi realizada empregando PVA 88% hidrolisado como agente de suspensão na concentração de 1%

5.2 Reações de polimerização com adição de partículas magnéticas

A primeira metodologia utilizada, adição do fluido férrico ao meio de polimerização, não apresentou um produto satisfatório, formando partículas sem forma definida e tamanhos variados, além de não apresentar características magnéticas, mostrando que a magnetita que se encontrava no meio não foi incorporada ao polímero formado, permanecendo em sua maior parte na fase aquosa . A metodologia na qual a magnetita seca e triturada, foi adicionada ao meio reacional, originou partículas sem forma definida, levemente magnetizadas, com algumas partículas sendo fracamente atraídas por imãs e outras não. Estas duas metodologias foram consideradas insatisfatórias na produção das partículas magnéticas de STY-DVB, visto que os produtos obtidos não atenderam às características esperadas de magnetização e uniformidade para um suporte magnetizado para imobilização de enzimas.

A reação que apresentou o produto com melhor magnetização e maior uniformidade foi a reação utilizando magnetita com a superfície modificada com ácido oleico, originando partículas de tamanho uniforme e magnetização satisfatória, sendo atraídas por um imã, como mostrado na Figura 6. Portanto esta foi então a metodologia selecionada para dar seguimento à pesquisa.

A modificação da superfície da magnetita com ácido oleico permitiu maior incorporação deste material ao polímero. Tal fato deve estar relacionado à adsorção do ácido carboxílico à magnetita, na forma de carboxilato conforme ilustração da Figura 7 (LIU et al, 2006). O ácido se dissocia em meio aquoso e interage com o óxido de ferro na forma do íon carboxilato (oleato, no caso do ácido oleico) que gera interações intermoleculares devido as cargas elétricas dos íons, a extermidade hidrofóbica permite que as partículas magnéticas se dispersem no meio orgânico preferencialmente sobre o meio aquoso, como mostrado na Figura 8, que mostra um teste realizado utilizando uma mistura de água e um composto orgânico. Foram testados estireno e heptano, por serem duas das substâncias presentes na fase orgânica da polimerização. É possível visualizar como a magnetita se encontra totalmente na fase aquosa na primeira imagem (a), antes de passar pela modificação com o ácido oleico, ao contrário da imagem (b), onde as partículas magnéticas após a modificação permanecem completamente na fase orgânica.

Figura 6 - Suporte de STY-DVB magnetizado sendo atraído por imã (campo magnético externo).



Fonte: Própria.

Com a adição de partículas sólidas ao meio de polimerização, foi necessário um aumento na velocidade de agitação de forma a estabilizar o meio. Foi utilizada a velocidade de agitação de 320 rpm.

Figura 7 - Interação da magnetita com ácido oleico.



Fonte: Própria.

Figura 8 - Teste de comparação da magnetita, como obtida, e magnetita modificada com ácido oleico, em mistura 1:1 de água:heptano; a) Magnetita sem modificação; b) Magnetita modificada com ácido oleico.



Fonte: Própria.

5.3 Influência do tamanho das partículas de suporte na imobilização

De modo a analisar a influência do tamanho das partículas dos suportes estudados na imobilização via adsorção física, foi realizado um teste de comparação de atividade hidrolítica utilizando três faixas de tamanho.

O material foi separado por peneiramento utilizando um conjunto de peneiras de aço inox (24, 35, 42, 80 mesh Tyler), sendo utilizados os materiais retidos nas peneiras de 35, 42 e 80 mesh, pois as partículas do polímero sintetizado se encontraram em sua maior parte dentro da faixa de tamanho selecionada para a análise (35-80 mesh). O suporte foi imobilizado pela técnica de adsorção física utilizando 0,25 g de lipase de *Candida rugosa* a cada 1 g de suporte. Sua atividade foi quantificada pelo método de hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al, 1999) e o rendimento de imobilização calculado. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 11.

	Suporte				
	STY-I	OVB	STY-DVB magnetizado		
Tamanho	Atividade (U g ⁻¹)	Rendimento (%)	Atividade (U g ⁻¹)	Rendimento (%)	
35 Mesh	1292,26 ± 65,75	64,35	$1456,43 \pm 71,21$	89,39	
42 Mesh	$1217,42 \pm 30,44$	60,25	1295,68 ± 58,16	84,41	
80 Mesh	1371,68 ± 10,92	68,47	1315,56 ± 27,42	80,47	

Tabela 11- Atividades hidrolíticas e rendimentos de imobilização obtidos para imobilização de lipase de *Candida rugosa* em diferentes faixas de tamanho dos suportes.

Fonte: Própria.

Os resultados mostram que o tamanho das partículas dos suportes não influenciou na imobilização da lipase de *Candida rugosa*, pois os valores obtidos das atividades hidrolíticas não apresentaram variação significativa. Concluiu-se, portanto, que todas as partículas selecionadas poderiam ser utilizadas na imobilização desta lipase. Ressalta-se ainda que os rendimentos de imobilização também foram próximos independentemente do tamanho das partículas, ficando em torno de 64,4 % para o suporte de STY-DVB e de 84,8% para o suporte magnetizado. Uma vez que as atividades hidrolíticas obtidas foram próximas, esta diferença nos valores dos rendimentos de imobilização do suporte magnetizado, que é facilmente controlado pela aplicação de um campo magnético externo.

5.4 Caracterização e comparação dos suportes magnetizados e não magnetizados

Para realizar as análises de caracterização morfológica dos suportes sintetizados, foram utilizadas as partículas retidas entre as peneiras de 24 e 35 mesh, devido a obtenção da maior quantidade dessas partículas formadas na polimerização, aliado ao fato de que nos testes anteriores não foi observada nenhuma influência significativa com relação ao tamanho das partículas do suporte imobilizado na atividade hidrolítica.

5.4.1 Análise de Área Superficial (B.E.T.)

A Tabela 12 mostra os valores de área superficial específica dos dois suportes estudados (STY-DVB e STY-DVB magnetizado), determinados por adsorção de um gás em equilíbrio, em condições isotérmicas, utilizando o método B.E.T.

Comparando a matriz STY-DVB magnetizada e não magnetizada observa-se que a adição de óxido de ferro à matriz polimérica ocasionou perda da área superficial específica, indicando uma possível interação entre as partículas magnéticas e a rede polimérica, notadamente por meio da alta densidade eletrônica dos anéis aromáticos presentes na estrutura da matriz. Resultados semelhantes foram obtidos por Mijone (2014) em relação ao suporte SiO₂-PVA puro e dopado com magnetita, no qual o material magnético apresentou área superficial específica de 224,0 m² g⁻¹, valor menor que o apresentado pelo suporte de STY-DVB magnetizado (341,2 m² g⁻¹).

Tabela 12 - Valores de área superficial obtidos na anál	ise B.E.T.
---	------------

Material	Área Superficial (m ² g ⁻¹)
STY-DVB	664,55
STY-DVB magnetizado	341,25

Fonte: Própria.

5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Por meio da análise realizada utilizando microscópio eletrônico de varredura, foi possível observar nas imagens da Figura 9 que o suporte de STY-DVB apresentou forma predominantemente esférica, ao contrário do suporte magnetizado (Figura 10) que não mostrou forma definida predominante. Acredita-se que a presença dos íons pode ter interferido na tensão interfacial, responsável pela formação e manutenção das partículas esféricas (gotas) durante a polimerização (ASUA, 2007; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007; BAO et al., 2003). Após estes resultados, foi realizado um teste de polimerização utilizando o agente de suspensão na concentração de 2% de PVA. Os produtos obtidos demonstraram formas mais próximas às esferas, sugerindo que a diferença de tensão interfacial gerada pelas partículas magnéticas pode ser compensada com o aumento na concentração do agente de suspensão. O produto obtido pode ser visualizado na imagem de microscopia óptica da Figura 11.

A análise permitiu comprovar também que a imobilização da lipase de *Candida rugosa* nos suportes utilizando a técnica de adsorção física apresentou bons resultados na interação enzima-suporte, pois comparando os materiais antes e depois da imobilização é possível visualizar que a enzima se encontra adsorvida à superfície do material, mostrando a eficiência do processo de imobilização. Em relação a imobilização, a mudança do suporte

não apresentou diferenças significativas na adsorção da enzima; as características específicas do material magnetizado (forma não definida e incorporação de partículas magnéticas) não prejudicaram o processo.

As imagens do material magnetizado mostraram também a existência de agregados de partículas de magnetita sobre a sua superfície irregular, conforme também descrito no trabalho de Formiga e colaboradores (2013).

Figura 9- Imagens de MEV: suporte STY-DVB ampliado 100x (a) e ampliado 500x (c) e do derivado imobilizado ampliado 100x (b) e ampliado 500x (d).



Fonte: Própria.

a) WD = 20 mm Meg = 100 X Signal A = SE1 EHT = 20.00 kV ۲ ⊢ 100 µm WD = 20 mm Mag = 100 X Signal A = SE1 EHT = 20.00 kV H 100 µm PMI PM d) Signal A = SE1 EHT = 20.00 kV WD = 20 mm Mag = 500 X Signal A + SE1 EHT = 20.00 kV . WD = 20 mm Mag = 500 X . ⊢ 20 µm H 20 µm PM PMI

Figura 10 - Imagens de MEV: suporte STY-DVB magnetizado ampliado 100x (a) e ampliado 500x (c) e do derivado imobilizado ampliado 100x (b) e ampliado 500x (d).

Fonte: Própria.

Figura 11- Foto de microscopia óptica do polímero magnetizado utilizando agente de suspensão 2% de PVA (m/v).



5.4.3 Difração de Raios-X

A técnica de difração de raios-X baseia-se na interação da radiação eletromagnética de comprimento de onda λ (\approx 0,1 nm) com planos de átomos do sólido cristalino. Os difratogramas obtidos na análise dos dois suportes sintetizados podem ser visualizados na Figura 12.

Figura 12 - Difratogramas de raios-X dos suportes sintetizados.



Fonte: Própria.

As análises resultaram em difratogramas típicos de amostras poliméricas, com pico característico de material polimérico amorfo identificado entre $2\theta = 18^{\circ}$ e $2\theta = 20^{\circ}$, assim como verificado por Neves e colaboradores (2011) em amostras de poliestireno e poliestireno magnetizado.

O pico em 35,5° encontrado na amostra de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STYDVB-M) é característico de reflexões de estrutura cristalina de espinélio, provenientes das partículas de Fe_3O_4 (NEVES et al., 2011; DUSSAN; CARDONA; GIRALDO, 2012), indicando a incorporação do material magnético à rede polimérica. A intensidade do pico em 35,5° está ligada a quantidade de magnetita presente na amostra, mostrando que a quantidade de material magnético presente no suporte é pequena, justificando a não identificação dos demais picos característicos dos óxidos de ferro. As amostras contendo magnetita causaram maior ruído na resolução da linha espectral, porém não prejudicaram a análise do material.

5.4.4 Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As amostras de magnetita e de magnetita modificada com ácido oleico foram analisadas por espectroscopia de infravermelho para verificar a mudança na estrutura do material após o tratamento. Os espectrogramas dos materiais estão apresentados na Figura 13. É possível notar que os dois espectros são muito semelhantes, apresentando diferenças apenas nas bandas de 1400, 1600, 2850 e 2930 cm⁻¹, provenientes do tratamento com ácido oleico.

Figura 13 - Espectros de FTIR das amostras de magnetita e magnetita modificada com ácido oleico.



Fonte: Própria.

Ambos os espectros apresentaram uma banda larga na região de 3400 cm⁻¹, relativa a deformação axial do grupamento OH em ligação hidrogênio intermolecular, sugerindo grupamentos hidroxilas ligados ao ferro, provenientes da água de hidratação e de cristalização. As bandas entre 500 e 600 cm⁻¹ estão relacionadas às ligações Fe²⁺-O²⁻ e Fe³⁺-O²⁻ da magnetita e maghemita (LI et al., 2011; WEI et al., 2012; XIE et al., 2009). A banda de 2850 e 2930 presente na análise da magnetita modificada corresponde a estiramentos C-H provenientes de grupo saturados -C-H oriundos do ácido oleico; as bandas entre 1650-1550 cm⁻¹ e em torno de 1400 cm⁻¹ provém das deformações axiais simétricas e assimétricas do íon carboxilato (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2006). Estas diferenças nos dois materiais analisados indicam a interação do ácido oleico com a magnetita, na forma de carboxilato, aumentando sua afinidade orgânica e permitindo sua incorporação à matriz polimérica, como descrito no item 5.2.

Os dois suportes sintetizados, STY-DVB e STY-DVB-M, também foram analisados por FTIR. Os espectros obtidos estão apresentados na Figura 14.

Figura 14 - Espectros de FTIR para as amostras de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e não magnetizado.



Fonte: Própria

Novamente foi indicada uma banda larga em 3400 cm⁻¹ referente a deformação axial do grupamento OH em ligação hidrogênio intermolecular, sugerindo grupamentos hidroxilas ligados à cadeia polimérica. As bandas relativas entre 1400-1500 cm⁻¹ e 1630 cm⁻¹ estão relacionadas com a vibração do anel benzênico, característica do poliestireno e seus copolímeros (LI et al., 2011). As bandas em 2850 cm⁻¹ e 2920 cm⁻¹ podem ser atribuídas a grupos saturados -C-H, enquanto os picos localizados em 1030 cm⁻¹ e 1100 cm⁻¹ se referem a deformações angulares da ligação C-H fora do plano (NASEF; SAID, 2003). A banda em 680 cm⁻¹ também está relacionada a vibração do anel benzênico, porém a maior intensidade no polímero magnetizado sugere interferência com a banda correspondente às ligações Fe-O, devido a presença das partículas magnéticas no material.

54

5.4.5 Análise de magnetização

Para verificar as propriedades magnéticas do material, foi realizada análise em um magnetômetro de amostra vibrante (VSM) e a curva de histerese obtida pode ser visualizada na Figura 15.

Figura 15 - Curva de Histerese das partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) sintetizadas.



Fonte: Própria.

A figura mostra uma curva típica de materiais superparamagnéticos, apresentando retentividade quase nula verificada pelo ciclo estreito de histerese, não apresentando variação na curva durante a magnetização e desmagnetização. O fato do magnetismo residual tender a zero comprova que as partículas de magnetita utilizadas possuem características superparamagnéticas, comuns aos óxidos de ferro (ZHAO; ZHANG; FENG, 2012).

As partículas analisadas apresentaram saturação de magnetização de aproximadamente 0,18 emu g⁻¹, que indica o ponto no qual um aumento da força de magnetização não exerce mais nenhuma influência sobre o material (CULLITY; GRAHAM, 2009). Apesar da baixa saturação de magnetização, esta quantidade já foi suficiente para permitir a atração do material por um campo magnético externo (imã), como já mostrado anteriormente.

5.5 Caracterização e comparação dos derivados imobilizados da lipase de *Candida rugosa*

5.5.1 Análise da influência de pH e temperatura

Para analisar a influência da temperatura e do pH na atividade hidrolítica da lipase na forma livre e imobilizada nos dois suportes estudados (STY-DVB e STY-DVB magnetizado), foi realizado um planejamento experimental 2² estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central. Os experimentos realizados, com os respectivos níveis reais e codificados das variáveis estudadas, encontram-se especificados na Tabela 8, já apresentada. Os resultados obtidos, em função das atividades hidrolíticas determinadas pelo método da hidrólise do azeite de oliva (SOARES et al., 1999), foram analisados com auxílio dos *softwares* Design-Expert 9.0 (Stat-Ease Corporation, USA) e Statistica versão 12 (StatSoft Inc., USA).

As reações foram realizadas utilizando erlenmeyers em *shaker* de agitação, durante 5 minutos. As atividades obtidas estão apresentadas na Tabela 13, sendo possível verificar que a menor variação entre os valores corresponde ao catalisador utilizando o suporte de STY-DVB, indicando que a alteração causada pela variação de temperatura e pH, na faixa estudada, não influencia significativamente sua atividade hidrolítica, permitindo assim, uma faixa de utilização ampla sem que haja perda de rendimento.

Em relação à lipase livre, é possível observar que os valores de atividade variaram entre 10597 e 18003, sendo o valor mais alto atingido com o nível alto de pH e nível central de temperatura. A análise de variância (ANOVA) ao nível de confiança de 95%, que se encontra discriminado na Tabela 14, mostra que o efeito da variável pH (B) foi significativo, tanto o termo linear quanto o quadrático, indicando que influencia fortemente a variável resposta estudada ao contrário da variável temperatura que não apresenta forte influência.

Os dados obtidos para a lipase de *Candida rugosa* livre se ajustaram ao modelo quadrático (p < 0,05), com falta de ajuste não significativa. Desta forma foi possível obter um modelo estatístico de acordo com a Equação 6 e gerar a superfície de resposta da Figura 16, onde é possível visualizar a influência positiva do aumento de pH e a fraca influência da temperatura, indicando valores maiores de atividade com o pH em torno de 8.

$$Y = 11977 - 667,79 * A + 2532,88 * B + 725 * AB + 225,31 * A^2 + 1573,06 * B^2$$
(6)

Em que Y = Atividade hidrolítica; A = Valor codificado da temperatura; B = Valor codificado de pH.

Tabela 13- Respostas obtidas no planejamento experimental para analisar a influência dos fatores A (temperatura, °C) e B (pH) na atividade hidrolítica (U g^{-1}) da lipase de *Candida rugosa* na forma livre e imobilizada em STY-DVB e em STY-DVB magnetizado.

	Fatores	Respostas (Valores de atividade hidrolítica, U g ⁻¹)			
Ex p	A: Temperatura	B: pH	Livre	STY-DVB	STY-DVB magnetizado
1	35	6	13101	2489	2247
2	55	6	10597	2347	2069
3	35	8	16796	2699	2853
4	55	8	17192	2730	2859
5	31	7	12925	2453	1899
6	59	7	10638	2598	1683
7	45	5.6	10951	2232	1695
8	45	8.4	18003	2741	2908
9	45	7	12083	2749	2359
10	45	7	12814	2474	2679
11	45	7	11034	2771	2088

Fonte: Própria.

Tabela 14 – Análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos para a lipase de *Candida rugosa* livre, sob um nível de confiança de 95%.

Fonte de Variação	Soma	Grau de	u de Média		P < 0.05
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
Modelo	7132.10^4	5	1426.10^4	13,95	0,0058
A-Temperatura	3568.10^3	1	3568.10 ³	3,49	0,1207
B-pH	5132.10^4	1	5132.10 ⁴	50,20	0,0009
AB	2103.10^3	1	2103.10 ³	2,06	0,2110
\mathbf{A}^2	2867.10 ²	1	2867.10 ²	0,28	0,6191
B ²	1397.10^4	1	1397.10 ⁴	13,67	0,0140
Resíduo	5112.10 ³	5	1022.10 ³		
Falta de Ajuste	3511.10 ³	3	1170.10 ³	1,46	0,4308
Erro Puro	1601.10 ³	2	8.10^{5}		
Cor Total	7643.10 ⁴	10			

Fonte: Própria.



Figura 16- Superfície de resposta obtida para a influência de pH e temperatura na atividade da lipase de *Candida rugosa* na forma livre.

Fonte: Própria.

Utilizando o *software* Design-Expert 9.0 foi possível obter um gráfico indicando a faixa de pH e temperatura necessários para se alcançar atividades hidrolíticas maiores que 15000 U g⁻¹, neste caso o gráfico da Figura 17 mostra que valores de pH maiores que 7,7 e temperatura entre 35-55 °C são suficientes para atingir estes valores, mostrando novamente que a temperatura não apresentou forte influência.

Os dados obtidos para a lipase imobilizada no suporte de STY-DVB estão analisados na forma de gráfico de Pareto na Figura 18, onde é possível observar os efeitos dos fatores estudados. Pode-se constatar pelo gráfico que apenas o termo pH linear foi significativo nesta análise, onde o valor positivo indica que o aumento deste fator influencia positivamente na variável resposta, seguindo a mesma tendência da lipase na forma livre, apresentando, portanto, maiores valores de atividade hidrolítica para pH próximo ao máximo dentro da faixa estudada. Os dados não se ajustaram ao modelo quadrático, porém permitiram avaliar a influência dos fatores selecionados.



Figura 17 - Gráfico de otimização de atividade hidrolítica da lipase de *Candida rugosa* livre em relação a pH e temperatura.

Fonte: Própria.

Figura 18 - Gráfico de Pareto de análise dos efeitos dos fatores estudados em relação a lipase de *Candida rugosa* imobilizada no suporte STY-DVB.



Fonte: Própria.

Em relação aos dados obtidos pela lipase imobilizada em STY-DVB magnetizado, é possível verificar pelo gráfico de Pareto na Figura 19 que o derivado imobilizado seguiu a mesma tendência do anterior, onde apenas o termo pH linear foi significativo no estudo, também com valor positivo mostrando que quanto maior este fator, maior será a variável resposta. Os dados para este suporte também não se ajustaram ao modelo quadrático, mas permitiram a análise de efeitos dos parâmetros estudados, mostrando que o pH é um fator determinante na utilização deste derivado imobilizado.

O planejamento experimental realizado permitiu estudar o comportamento dos biocatalisadores utilizados em relação a alterações de temperatura e pH, onde foi possível concluir que os derivados imobilizados seguiram a mesma tendência da lipase na forma livre, onde a temperatura dentro da faixa de 31 a 59 °C não influenciou significativamente os resultados obtidos em 5 minutos de reação, ao contrário do pH que mostrou forte influência, sendo que os valores de atividade hidrolítica foram maiores com o pH em torno de 8,0. Trabalhos anteriores reportaram resultados próximos, nos quais o pH ótimo para a lipase de *Candida rugosa* foi relatado como sendo entre 7,0 e 8,0 (PAULA et al., 2008; SIMOES et al., 2011).

Desta forma, os biocatalisadores estudados apresentaram o mesmo comportamento em relação ao pH, sendo o suporte de STY-DVB o que apresentou menor variação nos valores de atividade, seguido pelo suporte magnetizado, demonstrando o potencial destes derivados imobilizados na aplicação em reações de hidrólise.

Figura 19 - Gráfico de Pareto referente a análise dos efeitos dos fatores estudados em relação a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB magnetizado.



Fonte: Própria.

A influência de pH e temperatura na lipase na forma livre foi maior, visto que a técnica de imobilização aumenta a estabilidade do biocatalisador devido as ligações que se formam, permitindo o seu uso em uma faixa maior de pH e temperatura.

5.5.2 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

Foi analisada a influência da concentração do substrato na velocidade da reação de hidrólise do azeite de oliva, de modo que possibilitou a determinação dos parâmetros cinéticos Km e Vmáx. Foram comparados os resultados obtidos utilizando a lipase de *Candida rugosa* na sua forma livre, imobilizada no suporte STY-DVB não magnetizado e magnetizado. A concentração do azeite de oliva esteve entre 10 e 60% (m/v) em solução aquosa de goma arábica 7% (m/v). As reações foram realizadas em pH 8,0 a 40 °C.

As atividades hidrolíticas obtidas em função da concentração do substrato estão demonstradas na Figura 20, na qual os gráficos de concentração do substrato (mmol L^{-1}) *versus* velocidade de reação (U g⁻¹), estão relacionados com o modelo cinético de Michaellis-Menten demonstrado pela Equação 7.

Os parâmetros cinéticos foram calculados pelo *software Hyper 32*, utilizando o método de Lineweaver-Burke, onde é feita a linearização do modelo de Michaelis-Menten de cinética enzimátiva, como mostra a Equação 8, onde a velocidade utilizada foram os valores de atividade hidrolítica (U g⁻¹) obtidos.

$$v = \frac{Vmax * [S]}{Km + [S]} \tag{7}$$

$$\frac{1}{V} = \frac{Km}{Vmax} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{Vmax}$$
(8)

Os gráficos da Figura 20 mostram que a velocidade da reação de hidrólise aumenta significativamente nos 3 primeiros pontos até atingir a concentração de substrato de 1488 mmol L^{-1} (40%). Após esse valor a atividade enzimática tornou-se essencialmente independente da concentração nos 3 casos estudados, como prevê a cinética de Michaellis-Menten, indicando também que não houve inibição causada pelo produto dentro dos parâmetros estudados.

Figura 20 - Gráficos da relação das atividades hidrolíticas da lipase de *Candida rugosa*, livre e imobilizada, com variação da concentração do substrato, e ajuste ao modelo de Michaellis-Menten: a) Livre; b) Imobilizada em STY-DVB; c) Imobilizada em STY-DVB magnetizado.



Fonte: Própria.

A Tabela 15 apresenta os valores de Km e Vmáx, assim como o coeficiente de correlação da linearização, mostrando que os resultados se adequam ao método proposto.

Lipase	V _{máx} (U g ⁻¹)	K _m (mmol L ⁻¹)	R ²
Livre	22575	626	0,8928
Imobilizada em STY-DVB	3699	781	0,9847
Imobilizada em STY-DVB magnetizado	5870	1766	0,9614

Tabela 15- Valores das constantes cinéticas obtidas para a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada e seus respectivos coeficientes de correlação dos dados ao modelo de Lineweaver-Burke.

Fonte: Própria.

Os valores mais elevados de Km indicam uma menor afinidade da lipase pelo substrato, desta forma, o derivado magnetizado apresentou a menor afinidade, indicando dificuldade de difusão do substrato ao biocatalisador. Esta menor transferência de massa é típica de sistemas imobilizados, e podem ser atribuídos a mudanças conformacionais na estrutura terciária da lipase ou aos impedimentos estéricos gerados pelo suporte, que dificultam o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima (GOMES et al., 2006; VITOLO, 2001). A adição das partículas de magnetita ao polímero diminuiu consideravelmente a afinidade pelo substrato. Esta diminuição indica que a reação leva um tempo maior para atingir a velocidade máxima de conversão do substrato. Porém, deve-se ponderar também que o valor de Vmáx do derivado imobilizado magnetizado é maior que o do suporte não magnetizado.

A lipase livre apresentou maior afinidade pelo substrato, visto que não há dificuldades de difusão do meio devido à ausência de suporte, como reportado na literatura em diversos trabalhos que comparam a lipase de *Candida rugosa* na forma livre com a forma imobilizada em diferentes suportes (ARICA; SOYDOGAN; BAYRAMOGLU, 2010; GHIACI et al., 2009; PAULA et al., 2008; SIMOES et al., 2011; YONG et al., 2008).

5.5.3 Estabilidade Térmica

A Tabela 16 mostra os parâmetros de coeficiente de desativação térmica (kd) e tempo de meia vida $(t_{1/2})$ para a enzima livre e para os derivados imobilizados incubados a 60°C. Os resultados indicam que o processo de imobilização forneceu maior estabilidade térmica à enzima, aumentando consideravelmente seu tempo de meia-vida, confirmando

uma das principais vantagens da técnica de imobilização (GUISÁN, 2006; ZHANG et al., 2012).

A enzima livre apresentou um decaimento significativo nos seus valores de atividades hidrolíticas após 15 minutos de incubação, enquanto para os derivados imobilizados esse decaimento foi menos marcante. Após 3h de incubação os derivados ainda apresentaram cerca de 70% de atividade residual, enquanto a lipase livre demonstrou atividade residual em torno de 20%.

Os valores das constantes de inativação térmica (Kd) evidenciaram a diferença das estabilidades da enzima na forma livre e imobilizada quando expostas à temperatura de 60 °C, apresentando um significativo decaimento desta constante nos derivados imobilizados. O maior tempo de meia vida foi encontrado para o derivado magnetizado (cerca de 10h), indicando interações estáveis entre a enzima e o suporte magnético formadas no processo de imobilização, melhorando assim a estabilidade térmica desse biocatalisador quando comparado ao derivado imobilizado não magnético. A imobilização aumentou a estabilidade térmica da lipase em 34 vezes no caso do suporte de STY-DVB e em 51 vezes quando o suporte utilizado foi o STY-DVB magnetizado.

Tabela 16- Constantes de desativação térmica (incubamento a 60 °C) e tempos de meia-vida para a lipase de *Candida rugosa* livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado.

Sistema	kd (h^{-1})	$t_{\frac{1}{2}}(h)$
LCR Livre	3,46	0,2
LCR imobilizada em STY-DVB	0,10	6,8
LCR imobilizada em STY-DVB magnetizado	0,07	10,2

Fonte: Própria.

5.5.4 Estabilidade operacional e de estocagem da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB magnetizado

A técnica de imobilização de enzimas deve conferir estabilidade ao biocatalisador permitindo sua fácil separação do meio reacional e subsequente reutilização sem perda de atividade catalítica (JEGANNATHAN et al., 2008), deste modo, o biocatalisador magnetizado foi recuperado por filtração, lavado exaustivamente com heptano e reutilizado em novas reações de esterificação para fornecer informações sobre a estabilidade operacional do derivado imobilizado. Foram realizadas 6 reações de reciclo, utilizando as condições reacionais já descritas para a síntese do butirato de n-butila. As conversões obtidas podem ser visualizadas na Figura 21, onde é possível observar que altas conversões foram atingidas mesmo após 7 bateladas.

As reações de reciclo atingiram conversões entre 90% e 98%, indicando que a imobilização foi bem sucedida conferindo estabilidade operacional ao biocatalisador, o qual pode ser reutilizado por no mínimo 6 vezes sem perder seu poder catalítico, apresentando conversões bastante boas na esterificação do butirato de n-butila sob as condições aplicadas.

Figura 21- Conversões obtidas nas reações de esterificação reutilizando o mesmo biocatalisador por 7 bateladas consecutivas.



Fonte: Própria.

Analisando a tendência dos dados foi possível extrapolar os valores e obter o tempo de meia vida do biocatalisador. O valor obtido de tempo de meia-vida ($t_{1/2}$ = 52 dias) foi o dobro do relatado por Oliveira e colaboradores (2000) e confirma a alta estabilidade operacional do derivado imobilizado magnetizado. Estes dados sugerem que a incorporação de partículas magnéticas ao polímero não prejudicou a síntese do éster mesmo após seguidas reutilizações, indicando que o suporte magnetizado estudado possui potencial de aplicação com reutilização do biocatalisador em bateladas consecutivas e em reatores de fluxo contínuo.

Para verificar a estabilidade do biocatalisador magnetizado à estocagem, este foi submetido a um armazenamento durante 8 meses a 4 °C, apresentando perda de apenas 8% na atividade hidrolítica inicial após este período. Caso esta tendência se mantenha, o tempo de meia-vida para estocagem a 4 °C pode ser estimado e calculado em aproximadamente 50 meses.

5.6 Caracterização e comparação dos derivados imobilizados de Burkholderia cepacia

Os derivados imobilizados obtidos a partir da lipase PS de *Burkholderia cepacia* (LPS) foram caracterizados seguindo a mesma metodologia adotada para a lipase de *Candida rugosa*, comparando os resultados da lipase livre com as imobilizações nos suportes magnetizado e não magnetizado.

As atividades hidrolíticas, bem como os rendimentos de imobilização obtidos em relação a lipase PS estão indicados na Tabela 17. Os elevados valores de rendimentos de imobilização demonstram que grande parte das unidades de lipase oferecidas no processo de imobilização interagiu com os suportes, sendo o suporte magnetizado mais propício para a imobilização desta lipase, apresentando valores mais elevados de atividade hidrolítica e rendimento de imobilização (1956 U g⁻¹ e 71,7%, respectivamente).

	Atividade hidrolítica $(U g^{-1})$	Rendimento de imobilização
LPS livre	13358 ± 221	-
LPS imobilizada em STY-DVB	1694 ± 85	58,2%
LPS imobilizada em STY-DVB magnetizado	1956 ± 79	71,7%

Tabela 17 - Atividades hidrolíticas e rendimentos de imobilização obtidos pela lipase de *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado

Fonte: Própria.

5.6.1 Análise da influência de pH e temperatura

Similarmente aos biocatalisadores da lipase de *Candida rugosa*, foi realizado um planejamento experimental 2² estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central para analisar a influência da temperatura e do pH na atividade hidrolítica da lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS) tanto na sua forma livre como imobilizada nos dois suportes estudados (STY-DVB e STY-DVB magnetizado).

A Tabela 18 apresenta os resultados obtidos a partir do planejamento experimental, que seguiu os mesmo parâmetros e níveis dos fatores adotados no estudo da lipase de *Candida rugosa*. É possível observar que a maior variação nos valores de atividade hidrolítica ocorreu para a lipase livre, não sendo observada diferença significativa para os derivados imobilizados, apresentando valores muito próximos. Novamente foi possível notar que o pH influenciou fortemente os resultados de atividade hidrolítica, obtendo-se valores mais elevados em meios mais alcalinos.

A Tabela 19 apresenta a análise da variância (ANOVA) para a LPS livre, também realizada com nível de confiança de 95%. Neste caso foi possível concluir que tanto o efeito da variação linear do pH quanto da variação quadrática da temperatura foram significativos, indicando que para este gênero de lipase a temperatura do meio reacional causa uma maior influência na sua atividade catalítica (DA RÓS, 2009).

Foi possível ajustar os dados obtidos ao modelo quadrático (Equação 9) com superfície de resposta representada pela Figura 22.

$$Y = 14196,33 - 172,04 *A + 5389,85 *B + 668,50* AB - 1298,17 *A^{2} + 212,33 *B^{2}$$
(9)

Em que: Y = atividade hidrolítica, A = Valor codificado da temperatura e B = Valor codificado de pH.

Figura 22 - Superfície de resposta obtida para a variação de atividade hidrolítica em função de pH e temperatura para a LPS livre.



Fonte: Própria.

	Fatores		Respostas (Valores de atividade hidrolítica, U g ⁻¹)			
Exp	A: Temperatura	B: pH	Livre	STY-DVB	STY-DVB magnetizado	
1	35	6	8121	1311	1164	
2	55	6	7346	1421	1379	
3	35	8	18236	2158	2245	
4	55	8	20135	2076	1827	
5	31	7	12135	1528	1294	
6	59	7	10367	1750	1883	
7	45	5.6	7125	1215	1181	
8	45	8.4	21419	1830	2225	
9	45	7	14621	1591	1534	
10	45	7	14582	1717	1720	
11	45	7	13386	1608	1573	

Tabela 18 -Respostas obtidas no planejamento experimental para analisar a influência dos fatores A (temperatura, °C) e B (pH) na atividade hidrolítica (U g-1) da lipase de *Burkholderia cepacia* na forma livre e imobilizada em STY-DVB e em STY-DVB magnetizado

Fonte: Própria.

Analisando os dados é possível prever o comportamento da lipase de *Burkholderia cepacia* em relação às variáveis pH e temperatura, que mostra que uma variação linear positiva da atividade hidrolítica é obtida ao aumentar o valor do pH, assim como uma variação quadrática é esperada em resposta a alteração da temperatura.

Diferentemente da LCR, a análise estatística dos derivados imobilizados obtidos a partir da lipase de *Burkholderia cepacia* resultaram em modelos matemáticos. As Tabelas 20 e 21 ilustram a análise da variância (ANOVA) com nível de confiança de 95% para a LPS imobilizada em suporte não magnetizado e magnetizado, respectivamente e apontam significância apenas para o parâmetro pH linear, assim como os imobilizados da lipase de *Candida rugosa*.

Fonte de Variação	Soma	Grau de	Média	F	P < 0.05
	Quadrática	Liberdade	Quadrática		
Modelo	2461.10 ⁵	5	4923.10 ⁴	54,62	0,0002
A-Temperatura	2368.10 ²	1	2368.10^2	0,26	0,6301
B-pH	2324.10 ⁵	1	2324.10 ⁵	257,68	< 0,0001*
AB	1788.10 ³	1	1788.10 ³	1,98	0,2181
A ²	9517.10 ³	1	9517.10 ³	10,56	0,0227
B ²	2546.10 ²	1	2546.10 ²	0,28	0,6178
Resíduo	4506.10 ³	5	9012.10^2		
Falta de Ajuste	3520.10 ³	3	1173.10 ³	2,38	0,3095
Erro Puro	9857.10 ²	2	4929.10 ⁵		
Cor Total	2506.10 ⁵	10			

Tabela 19 - Análise de Variância (ANOVA) em função de atividade hidrolítica com variação de pH e temperatura utilizando a LPS na forma livre, sob o nível de 95% de confiança.

Fonte: Própria.

Tabela 20- Análise de Variância (ANOVA) em função de atividade hidrolítica com variação de pH e temperatura utilizando a LPS imobilizada em STY-DVB, sob o nível de 95% de confiança

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P < 0.05
Modelo	7417.10^2	5	1483.10^2	6,12	0,0343
A-Temperatura	14616,69	1	14616,69	0,60	0,4726
В-рН	7031.10^2	1	7031.10^2	29	0,0030*
AB	9216	1	9216	0,38	0,5645
\mathbf{A}^{2}	9196	1	9196	0,38	0,5649
B ²	1808,53	1	1808,53	0,075	0,7957
Resíduo	1212.10^2	5	24244		
Falta de Ajuste	1119.10^2	3	37290,44	7,98	0,1134
Erro Puro	9348,67	2	4674,33		
Cor Total	8629.10 ²	10			

Fonte: Própria.

A Equação 10 com superfície de resposta ilustrada na Figura 23 representa o modelo gerado para o derivado imobilizado não magnetizado, enquanto a Equação 11 e a Figura 24 ilustram o modelo obtido para o biocatalisador magnetizado.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P < 0.05
Modelo	1296.10^3	5	2591.10^2	8,42	0,0177
A-Temperatura	49608,06	1	49608,06	1,61	0,2601
B-pH	1129.10^3	1	1129.10^3	36,69	0,0018*
AB	1002.10^2	1	1002.10^2	3,26	0,1310
\mathbf{A}^2	384,35	1	384,35	0,012	0,9154
B ²	13558,59	1	13558,59	0,44	0,5362
Resíduo	1539.10^2	5	30774,01		
Falta de Ajuste	1346.10^2	3	44876,01	4,66	0,1816
Erro Puro	19242	2	9621		
Cor Total	1449.10^3	10			

Tabela 21 - Análise de Variância (ANOVA) em função de atividade hidrolítica com variação de pH e temperatura utilizando a LPS imobilizada em STY-DVB magnetizado, sob o nível de 95% de confiança

Fonte: Própria.

$$Y = 1638,67 + 42,74* A + 296,47* B - 48,00* AB + 40,35* A^2 - 17,90* B^2$$
(10)

$$Y = 1609,00 + 78,75* A + 375,68* B - 158,25* AB - 8,25* A^2 + 49,00* B^2$$
(11)

Em que: Y = atividade hidrolítica, A = Valor codificado da temperatura e B = Valor codificado de pH.

A partir das superfícies de resposta é possível observar que a atividade hidrolítica apresentada pelo biocatalisador aumenta de acordo com o aumento linear do pH.

Esse comportamento da enzima LPS livre corrobora com os resultados obtidos por Da Rós (2009), uma vez que pH e temperatura se mostraram significativos na análise estatística. Além disso, os resultados obtidos estão de acordo com Simões e colaboradores (2011) e Blanco e colaboradores (2004), que afirmam que os suportes oferecem maior estabilidade às enzimas e permitem sua aplicação em intervalos mais amplos das condições do meio reacional. O pH ideal obtido foi próximo a 8, o que condiz com a literatura (PADILHA *et al.*, 2012).
Figura 23 - Superfície de resposta obtida para a variação de atividade hidrolítica em função de pH e temperatura para a LPS imobilizada em STY-DVB.



Fonte: Própria.

Figura 24 - Superfície de resposta obtida para a variação de atividade hidrolítica em função de pH e temperatura para a LPS imobilizada em STY-DVB magnetizado (STY-DVB-M)



Fonte: Própria.

Em síntese, a relação entre os parâmetros de pH e temperatura para os biocatalisadores imobilizados a partir das lipases de *Candida rugosa* e de *Burkholderia cepacia* apresentou o mesmo perfil, sendo o potencial dos derivados imobilizados confirmados pelo bom desempenho apresentado em todas as condições de estudo.

5.6.2 Determinação dos Parâmetros Cinéticos

A influência da concentração do substrato na velocidade da reação de hidrólise do azeite de oliva utilizando a LPS livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado foi analisada da mesma forma que a LCR, variando-se a concentração do substrato entre 0 e 2232 mmol L⁻¹. Os resultados permitiram determinar as constantes cinéticas (Km e Vmáx) a partir do ajuste dos dados ao modelo cinético de Michaellis-Menten, sendo analisados empregando o método de regressão de Lineweaver-Burke, assim como já demonstrado anteriormente para a lipase de *Candida rugosa*.

A Figura 25 apresenta os resultados obtidos em comparação ao modelo ajustado, sendo possível verificar que os dados se adequaram ao modelo cinético proposto. É possível verificar também que a maior taxa de elevação na velocidade ocorreu nos 3 primeiros pontos, atingindo um patamar praticamente estável após esta concentração de substrato (a partir de 1488 mmol L⁻¹), assim como ocorreu com a lipase de *Candida rugosa*.

A Tabela 22 apresenta os valores calculados das constantes cinéticas (Km e Vmáx), assim como o coeficiente de correlação (R²) das linearizações, que confirmaram o ajuste do modelo proposto.

Os parâmetros cinéticos da lipase de *Burkholderia cepacia* seguiram a mesma tendência que os parâmetros da lipase de *Candida rugosa*, demonstrando um aumento no valor do Km para os derivados imobilizados em relação à lipase livre, indicando uma menor afinidade pelo substrato devido a dificuldades de transferência de massa causadas por impedimentos estéricos gerados pelo suporte sólido (GOMES et al., 2006; VITOLO, 2001). O derivado magnetizado também apresentou os maiores valores de Km e de Vmáx, indicando que as partículas magnéticas dificultam a transferência de massa do meio reacional, porém não prejudicam o desempenho da velocidade em altas concentrações de substrato, atingindo ainda maiores velocidades reacionais.

Figura 25 - Gráficos da relação das atividades hidrolíticas da lipase de *Burkholderia cepacia*, livre e imobilizada, com variação da concentração do substrato, e ajuste ao modelo de Michaellis-Menten: a) Livre; b) Imobilizada em STY-DVB; c) Imobilizada em STY-DVB magnetizado.



Fonte: Própria.

	Vmáx	Km	R ²
LPS livre	19797,26	981,92	0,9925
LPS Imobilizada em STY-DVB	3039,96	1506,38	0,9946
LPS Imobilizada em STY-DVB magnetizado	5273,28	2693,20	0,9352

Tabela 22 - Valores das constantes cinéticas obtidas para a LPS livre e imobilizada e seus respectivos coeficientes de correlação dos dados ao modelo de Lineweaver-Burke

Fonte: Própria.

5.6.3 Estabilidade Térmica

A estabilidade térmica da LPS livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado foi analisada da mesma forma que os biocatalisadores de LCR, com incubação dos biocatalisadores a 60 °C por 3h. As constantes de desativação térmica e os tempos de meia vida calculados encontram-se discriminados na Tabela 23. Comprovou-se novamente que a técnica de imobilização utilizada ocasionou um aumento na estabilidade térmica da enzima, aumentando os valores de tempo de meia vida em mais de 2 vezes.

Tabela 23 - Constantes de desativação térmica (incubamento a 60 °C) e tempos de meia-vida para a lipase de *Burkholderia cepacia* livre e imobilizada em STY-DVB e STY-DVB magnetizado

Sistema	kd (h^{-1})	t 1/2
		(h)
LPS Livre	0,143	4,85
LPS imobilizada em STY-DVB	0,065	10,66
LPS imobilizada em STY-DVB magnetizado	0,061	11,36

Fonte: Própria.

Da mesma forma que para a LCR, o tempo de meia vida obtido para LPS imobilizada no suporte magnetizado também apresentou os melhores resultados, com valores superiores aos encontrados por Silva e colaboradores (2011) ao imobilizar a mesma lipase em um polímero híbrido derivado de siloxano e quitosana ($t_{1/2} = 2,1$ h).

5.6.4 Estabilidade operacional e de estocagem

Recentemente, resultados muito satisfatórios têm sido obtidos na aplicação da lipase de *Burkholderia cepacia* em reações de transesterificação para síntese de biodiesel

(REBELO *et al.*, 2010). Assim, o desempenho do biocatalisador em suporte STY-DVB magnetizado desta enzima foi avaliado na transesterificação do óleo de coco com etanol, sendo efetuadas 7 bataleadas consecutivas para verificar a estabilidade operacional. As sínteses foram realizadas por 48 horas e foram acompanhadas por análise de cromatografia em fase gasosa para a identificação dos ésteres formados. Os resultados são apresentados na Figura 26.

A análise dos resultados permite concluir que a LPS imobilizada em STY-DVB magnetizado apresenta grande potencial de aplicação na transesterificação de óleos vegetais, atingindo rendimentos reacionais de 80%.

Ressalta-se que todas as reações atingiram rendimentos elevados, não havendo perda considerável de poder catalítico do biocatalisador durante os seis reciclos, já que todas as reações indicaram rendimentos superiores a 70%. Esses resultados concordam com os obtidos por Rebelo e colaboradores (2010), que imobilizou a mesma lipase em nanopartículas magnetizadas e também obteve conversões superiores a 50% durante oito ciclos sucessivos.

A partir destes resultados, foi possível calcular o tempo de meia vida da lipase imobilizada em copolímero magnetizado, correspondendo a 970 horas, ou aproximadamente 40 dias.

Assim, o principal objetivo da imobilização da enzima em suporte polimérico magnetizado também foi confirmado para este biocatalisador, pois forneceu à LPS imobilizada elevada estabilidade operacional e capacidade de fácil recuperação do meio reacional para reuso, sem interferência das partículas magnéticas durante as sínteses, assim como mostrado para a LCR neste e em outros trabalhos utilizando o mesmo ou material semelhante como suporte para imobilização de enzimas (OLIVEIRA, 1999; OLIVEIRA; ALVES; DE CASTRO, 2000).

A lipase PS imobilizada no suporte magnetizado foi armazenada à 4 °C durante o período de 6 meses, para verificar a estabilidade do biocatalisador quanto à estocagem, apresentando perda de apenas 8,8% da sua atividade hidrolítica após este período. Seguindo esta tendência, o tempo de meia-vida para estocagem à 4 °C foi calculado em aproximadamente 34 meses, sugerindo mais uma vez a elevada estabilidade dos derivados imobilizados.



Figura 26 - Conversões das reações de transesterificação enzimática por 7 bateladas sucessivas.

Fonte: Própria.

5.7 Aplicação de lipase de Candida rugosa livre e imobilizada na síntese de ésteres

Dentre as diversas aplicações industriais de lipases imobilizadas, a síntese de ésteres de cadeia curta apresenta destaque na aplicação como compostos flavorizantes e aromatizantes (DHAKE et al., 2013). Desta forma a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB magnetizado foi avaliada em relação a síntese de butirato de n-butila em relação a paramêtros reacionais e comparação à lipase livre e imobilizada em STY-DVB.

O comportamento das reações de esterificação pode ser observado nos gráficos da Figura 27 (a-c), onde pode ser analisado o consumo dos reagentes e a formação do produto no decorrer do tempo.

Observando a conversão final de cada reação (Tabela 24), pode-se verificar que os três sistemas atingiram conversões elevadas num período de 24 h de reação. Verifica-se que o álcool (reagente limitante) foi praticamente todo consumido, mostrando que todos os catalisadores testados apresentam potencial de aplicação em reações de esterificação. O maior porcentual de conversão foi obtido pelo sistema magnetizado (93,86%), que apresentou também maior valor de atividade de esterificação em 6 h de reação e consequentemente produtividade, como mostrado na Tabela 24.

O sistema utilizando o suporte magnetizado apresentou melhor cinética reacional, com conversão mais rápida como visualizado pelas curvas do gráfico da Figura 21 (c).

Trabalhos anteriores mostraram que a relação molar ácido:álcool neste tipo de reação deve ser maior que 1,5 para atingir maiores conversões, hipótese relacionada com os valores dos coeficientes de partição do butanol e do ácido butírico (medida da taxa de migração dos reagentes para a fase sólida). Para este sistema imobilizado, em trabalho anteriormente realizado por Oliveira *et al.* (2000) empregando como suporte de imobilização o copolímero de estireno-divinilbenzeno, foi observado preferencialmente a migração do butanol para o sistema imobilizado, devido ao seu maior valor de coeficiente de partição. Desta forma foi necessário um meio com um excesso de ácido para tornar possível a competição entre os reagentes para alcançar o sítio ativo do biocatalisador.

Figura 27- Gráficos de acompanhamento da reação de esterificação: a) Lipase livre; b) Lipase imobilizada em STY-DVB; c) Lipase imobilizada em STY-DVB magnetizado.



Fonte: Própria.

Pode-se considerar também que o derivado magnetizado apresentou propriedades cinéticas diferentes. Assim como na reação de hidrólise a velocidade máxima de reação foi maior que o sistema utilizando STY-DVB não magnetizado. Neste caso, a velocidade de reação está relacionada com o valor de atividade de esterificação, justificando assim conversões maiores em menor tempo de reação.

Lipase de Candida rugosa	Atividade de esterificação (µM g ⁻¹ min ⁻¹)	$\begin{array}{c} Produtividade\\ (g \ L^{\cdot 1} \ h^{\cdot 1}) \end{array}$	Conversão molar (%)	Rendimento (%)
Livre	1223,0	0,709	89,28	91,5
Imobilizada em STY-DVB	289,7	0,765	91,15	96,7
Imobilizada em STY-DVB magnetizado	311,5	0,795	93,86	97,2

Tabela 24- Atividade de esterificação, produtividade e conversão molar das reações de esterificação.

Fonte: Própria.

5.7.1 Influência da razão molar e quantidade de solvente na síntese de Butirato de n-Butila

As reações realizadas variando a razão molar e a concentração do substrato da esterificação do butirato de n-butila foram acompanhadas da mesma forma que as reações de esterificação realizadas anteriormente, os dados obtidos de conversão molar em 12 horas de reação foram aplicados nos *softwares* Design Expert 9.0 e Statistica 12.0 a fim de analisar a influência dos fatores estudados dentro de suas variações. As reações foram estendidas até 24 horas para verificar o a tendência comportamental neste tempo, comparativamente com os dados já analisados anteriormente.

O comportamento de cada reação acompanhada pode ser visualizado nos gráficos do Apêndice A, onde é possível observar o consumo dos reagentes e a formação do produto ao decorrer das 24 horas.

O substrato do ponto central, com razão molar ácido/álcool igual a 2 e concentração total do meio sendo 1200 mmol L^{-1} apresentou a melhor cinética reacional, atingindo conversão média de 68% em 6 horas de reação, e 92% de conversão em 24 h. As

conversões de cada experimento realizado ao decorrer do tempo estão indicadas na Tabela 25.

			Conversão (%) ao decorrer do			
			tempo			
Substrato	Razão Molar	Concentração	3h	6h	12h	24h
Substrato	(ácido:álcool)	Total (mmol L ⁻¹)				
S 0	2:1	1200	38,6	66,2	88,5	90,9
S0 (repetição)	2:1	1200	48,8	70,5	85,3	93,1
S 1	1:1	400	8,5	38,4	62,1	78,7
S 2	3:1	400	19,1	34,8	61,7	79,1
S 3	1:1	2000	3,2	11,2	22,4	74,9
S 4	3:1	2000	20,2	35	60,8	79,8

Tabela 25 - Conversões molares obtidas ao decorrer do tempo para as reações de esterificação.

Fonte: Própria.

As conversões molares calculadas em 12 horas de reação foram utilizadas na análise estatística, visto que neste ponto as reações apresentaram uma maior diferença nos dados obtidos. Os dados se adequaram ao modelo quadrático sob um nível de significância de 90%, apresentando como efeitos significativos os dois termos lineares, a interação dos fatores e o termo quadrático da razão molar. Com estes dados foi possível obter a análise de variância apresentada na Tabela 26.

Foi possível ajustar os dados obtidos ao modelo quadrático (Equação 12) com superfície de resposta representada pela Figura 28.

$$Y = 86,9 + 9,125*A - 35,525*A^2 - 10,175*B + 9,675*A*B$$
(12)

Em que Y=Conversão molar, A=Valor codificado de Razão Molar (ácido/álcool), B=Valor codificado de Concentração Molar total (mmol L^{-1}).

Fonte de Variação	Soma	Grau de	Média	F	P < 0,1	
	Quadrática	Liberdade	Quadrática			
Modelo	2804	4	701,08	136,93	0,0640	
A-Razão Molar	333,06	1	333,06	65,05	0,0785	
B-Concentração	414,12	1	414,12	80,88	0,0705	
AB	374,42	1	374,42	73,13	0,0741	
\mathbf{A}^{2}	1682,7	1	1682,7	328,65	0,0351	
B ²	0	0				
Erro Puro	5,12	1	5,12			
Cor Total	2809,43	5				

Tabela 26 - Análise de Variância (ANOVA) do planejamento experimental das esterificações

Fonte: Própria.

Figura 28- Superfície de Resposta para o Planejamento de Experimentos das Esterificações.



Fonte: Própria.

Pela superfície de resposta é possível prever resultados com a variação dos fatores analisados. Esta superfície indica que a razão molar que mais favorece a reação estudada é a de 2:1 ácido:álcool, já a concentração do meio, apesar de também ser significativo e influenciar a resposta, acarreta uma variação menor na conversão.

Analisando todos os dados de conversão ao decorrer do tempo, foi possível concluir que as variações do substrato acarretam mudanças em suas cinéticas reacionais, porém em 24 horas de reação foi possível atingir elevados valores de conversão para todos os casos analisados, com o ponto central apresentando melhores resultados em qualquer tempo analisado. O aumento da concentração do substrato diminuiu a velocidade reacional, porém uma maior razão molar foi suficiente para compensar este retardo, indicando que para maiores concentrações do meio é necessário um maior excesso de ácido no meio reacional para compensar o deslocamento da reação, mantendo a conversão elevada.

5.7.2 Influência do carregamento enzimático na síntese de Butirato de n-Butila

Para verificar a influência da quantidade de biocatalisador na síntese do Butirato de n-Butila, foram realizados experimentos empregando as condições reacionais otimizadas definidas no item 5.7.1, definidas pelo substrato S0 com razão molar 2:1 (ácido:álcool) e concentração total 1200 mmol L⁻¹ (ponto central do planejmaneto), foram realizadas 3 reações variando a quantidade de LCR imobilizada em STY-DVB magnetizado (1,0%, 2,5% e 4,0% m/v). O perfil das esterificações em relação ao consumo de butanol em função do tempo está ilustrado na Figura 29.

Pelas curvas do gráfico é possível verificar que as 3 reações atingiram elevadas conversões após 24 h, e a cinética reacional foi melhor com o aumento da concentração do biocatalisador no meio. A reação utilizando 4,0% de catalisador apresentou 84,6% de conversão em apenas 6 horas de reação, enquanto a reação com 1,0% de catalisador atingiu apenas 33,0% de conversão no mesmo tempo. Comparando as reações com 2,5% e 4,0% de catalisador verifica-se que elas não apresentaram diferenças discrepantes na cinética reacional, indicando que 2,5% de lipase imobilizada já foi suficiente para atingir uma velocidade de reação elevada.



Figura 29 - Consumo de Butanol nas reações de esterificação com variação da quantidade de biocatalisador.

Fonte: Própria.

Analisando os perfis do gráfico é possível verificar que os 3 experimentos atingiram elevadas conversões em 24 h, e a cinética reacional foi melhorada com o aumento da concentração do biocatalisador no meio reacional. Empregando-se 4,0% de biocatalisador foi obtida uma conversão de 84,6% em apenas 6 horas de reação, enquanto que a reação na qual utilizou-se 1,0% de biocatalisador atingiu apenas 33,0% de conversão no mesmo tempo. Comparando as reações efetuadas com 2,5% e 4,0% de biocatalisador, verifica-se que elas não apresentaram entre si diferenças discrepantes na cinética reacional, indicando que 2,5% de lipase imobilizada foi suficiente para atingir uma velocidade reacional elevada.

Em relação a reação empregando 4,0% de biocatalisador, verificou-se que a conversão máxima foi atingida em 12 h, visto que os dados obtidos em 24 h de reação mostraram um aumento da concentração dos reagentes e consumo do produto, indicando o favorecimento da reversibilidade da reação.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo a síntese e caracterização de uma matriz híbrida estável composta por poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizada pela adição de nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) sintetizadas a partir da co-preciptação dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺. Adicionalmente foi estudada a utilização deste material como suporte de imobilização de enzimas com aplicação em reações de biotransformações. Os estudos realizados geraram resultados que mostram o potencial de aplicação do material sintetizado, sendo possível concluir que:

- A modificação da superfície da magnetita com ácido oleico foi essencial para permitir sua incorporação à matriz polimérica. Tal fenômeno foi comprovado pelos testes de afinidade de fase (orgânica/inorgânica), pela magnetização do polímero produzido e pelas análises de FTIR que indicaram a presença do íon carboxilato (oleato) nas amostras de magnetita;
- As alterações estruturais apontadas pelas análises de BET e MEV no polímero sintetizado com a adição de magnetita não prejudicaram o processo de imobilização. Embora as análises de DRX, FTIR e VSM tenham indicado a presença das partículas magnéticas em pequenas quantidades no material sintetizado, a matriz sólida demonstrou atração por um campo magnético externo (imã), proporcionando um baixo custo de produção do material de interesse, já que não necessita de grandes quantidades de magnetita incorporada;
- Ambos os materiais sintetizados, poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e não magnetizado, mostraram elevado potencial de utilização como suportes na imobilização de enzimas, retendo grande parte da atividade fornecida na imobilização das lipases via adorsção física. Foi constatado que o tamanho das partículas dos materiais sintetizados não teve influência no rendimento de imobilização das lipases estudadas, dentro da faixa granulométrica considerada para estudo;

- A caracterização bioquímica dos derivados imobilizados indicou forte influência do pH na atividade hidrolítica, gerando melhores resultados com pH próximo a 8,0. Por outro lado a temperatura não teve influência significativa, afetando com mais intensidade as lipases livres, comprovando o aumento da estabilidade térmica dos derivados imobilizados, podendo ser utilizados em uma ampla faixa de temperatura. Esta elevação da estabilidade foi comprovada pela redução dos valores das constantes de desativação térmica e consequente aumento dos tempos de meia-vida após a imobilização. Os derivados magnetizados exibiram estabilidade térmica significativa (50 vezes no caso da LCR e 2,3 vezes para a LPS).
- A caracterização cinética indicou redução da afinidade pelo substrato nos derivados imobilizados, devido a impedimentos estéricos e dificuldades difusionais gerados pelos suportes de imobilização, no entanto, os derivados magnetizados apresentaram velocidades máximas superiores às obtidas pelo mesmo material não magnetizado, na reação de hidrólise do azeite de oliva;
- Os derivados de LCR apresentaram elevadas conversões nas reações de esterificação (89-95%), com destaque para o derivado magnetizado que apresentou maior conversão e rendimento, além de demonstrar elevada estabilidade operacional (t_{1/2}=52 dias). Os estudos de síntese do butirato de n-butila catalisada pelo derivado magnetizado indicaram que a razão molar possui influência significativa no termo quadrático. Os melhores resultados foram obtidos na razão próxima a 2:1 (ácido/álcool) e mostraram que 2,5% (m/v) de catalisador é suficiente para atingir elevadas conversões em curtos períodos de tempo. O derivado de LPS demonstrou forte potencial de aplicação na etanólise do óleo de coco, com rendimentos entre 70 e 80% e estabilidade operacional elevada com tempo de meia vida estimado em 40 dias;
- Os derivados magnetizados, tanto de LCR quanto de LPS, apresentaram elevada estabilidade de estocagem, com tempos de meia-vida estimado em 50 e 34 meses, respectivamente;

REFERÊNCIAS

ABD-ELHAKEEM, M. A.; ELSAYED, A. M.; ALKHULAQI, T. A. Activity and stability of immobilized *Candida rugosa* lipase on chitosan coated Fe₃O₄ nanoparticles in aqueous and organic media. **Journal of Advances in Chemistry**, v.10, p.2478-2483, 2014.

ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v.42, p.6406-6436, 2013.

AGUIEIRAS, E. C. G.; OLIVEIRA, E. D. C. FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v.159, p.52-67, 2015.

AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel: possibilities and challenges. **Biofuels**, **Bioproducts and Biorefining**, v.1, p.57-66, 2007.

ALFONSI, K.; COLBERG, J.; DUNN, P. J.; FEVIG, T.; JENNINGS, S.; JOHNSON, T. A.; KLEINE, H. P.; KNIGHT, C.; NAGY, M. A.; PERRY, D. A.; STEFANIAK, M. Green chemistry tools to influence a medicional chemistry and research chemistry based onganisation. **Green Chemistry**, v.10, p.31-36, 2008.

ARICA, M. Y.; SOYDOGAN, H.; BAYRAMOGLU, G. Reversible immobilization of *Candida rugosa* lipase on fibrous polymer grafted and sulfonated p(HEMA/EGDMA) beads. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v.33, p.227-236, 2010.

ASUA, J. M. Polymer Reaction Engineering. Wiley, Blackwell Publishing Ltd., 2007.

AYBASTIER, O.; DEMIR, C. Optimization of immobilization conditions of *Thermomyces lanuginosus* lipase on styrene-divinylbenzene copolymer using response surfasse methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.63, p.170-178, 2010.

BAO, Y.; LIAO, J.; HUANG, Z.; WENG, Z. Influences of individual and composed poly(vinyl alcohol) suspending agents on particle morphology of suspension poly(vinyl chloride) resin. **Journal of Applied Polymer Science**, v.90, p.3848-3855, 2004.

BARRETO, A. C. H.; MAIA, F. J. N.; SANTIAGO, V. R.; RIBEIRO, V. G. P.; DENARDIN, J. C.; MELE, G.; CARBONE, L.; LOMONACO, D.; MAZZETTO, S. E.; FECHINE, P. B. A. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluid Nanofluid**, v.12, p.677-686, 2012.

BAUTISTA, L. F.; VICENTE, G.; MENDOZA, A.; GONZÁLEZ, S.; MORALES, V. Enzymatic Production of Biodiesel from *Nannochloropsis gaditana* Microalgae Using Immobilized Lipases in Mesoporous Materials. **Energy & Fuels**, v.29, p.4981-4989, 2015.

BLANCO, R. M.; TERREROS, P.; FERNANDEZ-PÉREZ, M.; OTERO, C.; DÍAZ-GONZÁLEZ, G. Functionalization of mesoporous silica for lipase immobilization: Characterization of the support and the catalysts. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 30, p. 83-93, 2004.

BRUNO, L. M.; COELHO, J. S.; MELO, E. H. M.; LIMA-FILHO, J. L. Characterization of *Mucor miehei* lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol magnetic particles. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, n.2, p.189-192, 2005.

BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; DE CASTRO, H. F. Comparative performance of microbial lipases immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol particles. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, n.5, p889-896, 2008.

BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; DE CASTRO, H. F. Ester synthesis catalyzed by *mucor miehei* lipase immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.113-116, p.189-199, 2004.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and enzyme technology**. Weinheim: Wiley-VCH, 2005.

CAMILO, R.L. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recorbertas por 3-aminopropiltrietoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia. 2006. 159p. Tese (Doutorado) Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Autarquia associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CARRAHER JUNIOR, C. E. Introduction to Polymer Chemistry. 2nd ed. Los Angeles: Taylor and Francis Group, LLC: 2010. 510p. ISBN 978-1-4398-0953-2.

COUTINHO, F. M. B.; CUNHA, L.; GOMES, A. S. Suportes Poliméricos para Catalisadores Sulfônicos: Síntese e Caracterização. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.14, n.1, p.31-37, 2004.

CULLITY, B. D.; GHAHAM, C. D. Introduction to magnetic materials, 2nd ed. Weinheim: WILEY, 2009. 568p. ISBN: 978-1-118-21149-6.

DA RÓS, P. C. M. Etanólise de óleos vegetais por catálise enzimática acelerada por irradiação de microondas. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade de São Paulo, 2009, 123p.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, n.4, p.623-630, 2004.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v.27, n.1, p.146-156, 2004.

DHAKE, K. P.; THAKARE, D. D.; BHANAGE, B. M. Lipase: a potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavor and fragrance ester compounds. **Flavour Fragr. J.**, v.28, p.71-83, 2013.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Covalent attachment of microbial lipase onto microporous styrene-divinylbenzene copolymer by means of polyglutaraldehyde. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.66, p.34-38, 2008.

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

DUSSÁN, K. J.; CARDONA, C. A.; GIRALDO, O. Immobilization and characterization of the *Candida rugosa* lipase enzyme on magnetic particles. **Revista Mexicana de Física**, v.58, p.47-51, 2012.

FREIRE, G. D. M.; CASTILHO, L. R. Lipases produzidas por fermentação submersa e em meio sólido. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.81, p.48-56, 2000.

FRIED, J. R. Polymer Science & Technology. 2nd ed. Westford, Massachusetts: Prentice Hall: 2003. 582p. ISBN 0-13-018168-4.

GHIACI, M.; AGHAEI, H.; SOLEIMANIAN, S.; SEDAGHAT, M. E. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and eficiente support for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Applied Clay Science**, v.43, p.289-295, 2009.

GOMES, F. M.; PAULA, A. V.; SILVA, G. S.; de CASTRO, H. F. Determinação das propriedades catalíticas em meio aquoso e orgânico da lipase de *candida rugosa* imobilizada em celulignina quimicamente modificada por carbonildiimidazol. **Química Nova**, v.29, n.4, p.710-718, 2006.

GUIMARÃES, A. P. From Iodestone to supermagnets-understanding magnetic phenomena. Weinheim: WILEY-VCH, 2005. 200p. ISBN: 3527405577.

GUISÁN, J. M. Immobilization of enzymes for use in organic media, In: GUISÁN, J. M. (Ed). **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press: 2006. 449p. ISBN 1-58829-290-8.

GUO, Z.; BAI, S.; SUN, Y. Preparation and characterization of immobilized lipase on magnetic hydrophobic microspheres. **Enzyme and Microbial Technology**, v.32, n.7, p.776-782, 2003.

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

HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE. Simple and eficiente immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrenedivinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, p.72-78, 2011.

HUANG, F.; KE, C.; KAO, C.; LEE, W. Preparation and application of partially porous poly(styrene-divinylbenzene) particles for lipase immobilization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.80, p.39-46, 2001.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S.; PONCELET, D.; CHAN, E. S.; RAVINDRA, P. Production of biodiesel using immobilized lipase: a critical Review. **Criticals Reviews in Biotechnology**, v.28, p.253-264, 2008.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v.20, p.801-821, 2014.

JOSÉ, N. M.; PRADO, L. A. S. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n.2, p. 281-288, 2005.

LAURENT, S.; FORGE, D.; PORT, M.; ROCH, A.; ROBIC, C.; ELST, L. V.; MULLER, R. N. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological application. **Chemical Reviews**, v.108, p.2064-2110, 2008.

LEE, S. H.; DOAN, T. T. N.; WON, K.; HA, S.H.; KOO, Y.M. Immobilization of lipase within carbon nanotube-silica composites for non-aqueous reaction systems. **Journal of Molecular Catalys B**, v.62, p.169–172, 2010.

LEE, Y.; RHO, J.; JUNG, B. Preparation of magnetic ion-exchange resins by the suspension polymerization. **Journal of Applied Polymer Science**, v.89, p.2058-2067, 2003.

LI, T.; LIU, H.; ZENG, L.; YANG, S.; LI, Z.; ZHANG, J.; ZHOU, X. Macroporous magnetic poly(styrene-divinylbenzene) nanocomposites prepared via magnetite nanoparticles-stabilized high internal phase emulsions. **Journal of Materials Chemistry**, v.21, p.12865-12872, 2011.

LIU, C.; HUANG, C.; WANG, Y.; LEE, D.; CHANG, J. Biodiesel production by enzymatic transesterification catalyzed by *Burkholderia* lipase immobilized on hydrophobic magnetic particles. **Applied Energy**, v.100, p.41-46, 2012.

LIU, X.; KAMINSKI, M. D.; GUAN, Y.; CHEN, H.; LIU, H.; ROSENGART, A. J. Preparation and characterization of hydrophobic superparamagnetic magnetite gel. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.306, p.248-253, 2006.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.17, n.2, p.166-179, 2007.

MEDEIROS, S. F. **Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicação biomédica.** 292p. 2010. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, Lorena-SP, 2010.

MEDEIROS, S. F.; SANTOS, A. M.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Pharmaceutical Nanotechnology: Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.403, p.139-161, 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VELEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; DE GIORDANO, R. L. C.; DE CASTRO, H. F. Valuation of immobilized lipases on polyhydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.50, p.503–511, 2012.

MIJONE, P. D.; Imobilização de lipase em suporte magnetizado: desenvolvimento de técnicas de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos. 92 p. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, EEL-USP, Lorena, 2014.

MURILLO, N.; OCHOTECO, E.; ALESANCO, Y.; APOMPOSO, J.; RODRIGUEZ, J.; GONZALEZ, J.; VAL, J. J. D.; GONZALEZ, J. M.; BRITEL, M. R.; MVARELA-FERIA, F.; ARELLANO-LOPEZ, A. R. D. CoFe₂O₄-polypyrrole (PPy) nanocomposites: New multifunctional materials. **Nanotechnology**, v.15, p.322-327, 2004.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v.35, p.479-490, 2013.

NASEF, M.; SAID, H. Preparation of crosslinked cation exchange membranes by radiation grafting of styrene/divinylbenzene mistures onto PFA films. **Journal of Membrane Science**, v. 216, p.27-38, 2003

NASRATUN, M.; HASRUL, A. S.; SUREENA, A.; NURUL AINI, M. A.; RUWAIDA, A. R.; SHALYDA, M. S.; IDERIS, A.; ROZAIMI, A. S.; SHARIFUDDIN, J. H., AHAMAD NORDIN, N. I. A. Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on chitosan beads for transesterification reaction. **Journal of Applied Science**, v.10, p.2701–2709, 2010.

NEVES, J. S.; SOUZA, F. G.; SUAREZ, P. A. Z.; UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. In situ production of polystyrene magnetic nanocomposites through a batch suspension polymerization process. **Macromolecular Materials and Engineering**, v.296, p.1107-1118, 2011.

OLIVEIRA, P. C. Estudo da imobilização de lipase em copolímero de estirenodivinilbenzeno e aplicação na síntese do butirato de butila. 92 p. 1999. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 1999. OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; DE CASTRO, H. F. Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, v.5, p.63-71, 2000.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; DE CASTRO, H. F.; MEI, I. L. H. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estirenodivinilbenzeno. **Química Nova**, v.23, n.5, 2000.

PADILHA, G. S.; SANTANA, J. C. C.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. Extraction of lipase from Burkholderia cepacia by PEG/Phosphate ATPS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, 2012.

PAULA, A. V.; MOREIRA, A. B. R.; BRAGA, L. P.; de CASTRO, H. F. Comparação do desempenho da lipase de *candida rugosa* imobilizada em suporte hibrido de polissiloxano-polivinilálcool empregando diferentes metodologias. **Química Nova**, v.31, n.1, p.35-40, 2008.

POLSHETTIWART, V.; LUQUE, R.; FIHRI, A.; ZHU, H.; BOUHRARA, M.; BASSET, J. M. Magnetically recoverable nanocatalysts. **Chemical Reviews,** v.111, p. 3036-3075, 2011.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v.33, p.511-525, 2015.

RAVI, B.; MEHROTRA, S.; MEHROTRA, R. Advances in heterogeneous and enzymatic catalysis for the industrial production of biodiesel by transesterification: an overview. **Current Chemical Biology**, v.7, p.104-113, 2013.

REBELO, L. P.; NETTO, G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Enzymatic kinetic resolution of (RS)-1-(phenyl) etanol by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, n.8, p.1537-1542, 2010.

REN, Y.; RIVERA, J. G.; HE, L.; KULKARNI, H.; LEE, D.; MESSERSMITH, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanopartocles via a biomimetic coating. **BMC Biotechnology**, 11:63, 2011.

ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. Properties of magnetic suports in relation to immobilized enzyme reactors. **Biotechnology Bioengineering**, v.15, p.603-606, 1973.

RODRIGUES, R. C. Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual. 183 p. 2009. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v.42, p.6290-6307, 2013.

SAKAI, S.; LIU, Y.; YAMAGUCHI, T.; WATANABE, R.; KAWABE, M.; KAWAKAMI, K. Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitryle fibers. **Bioresource Technology**, v.101, p.7344–7349, 2010.

SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p.1007-1011, 2006.

SANTOS, J. C.; BUENO, T.; DA RÓS, P. C. M.; DE CASTRO, H. F. Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvente-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.82, p.956-961, 2007.

SILVA, G. S.; OLIVEIRA, P. C., GIORDANI, D. S. DE CASTRO, H. F. Chitosan/siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and performance as a support for immobilizing enzyme. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 22, n.8, 2011.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**, 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Livros Técnicos e Científicos, 2006.

SIMÕES, A. S.; MORI, R. Y.; FARIA, R.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Desempenho da matriz híbrida SiO₂-Quitosana na imobilização da lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v.34, n.1, p.33-38, 2011.

SOARES, C. M. F.; de CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.77-9, p.745-757, 1999.

SOUZA, M. C. M. **Imobilização de lipase de** *Candida antarctica* **do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres.** 87 p. 2013. Tese (Doutorado) – Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

TEIXEIRA, L. F.; BÔAS, R. V., OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Effect of natural antioxidants on the lipase activity in the course of batch and continuous glycerolysis of babassu oil. **Bioprocess Biosystems Engineering**, p.1-9, 2014.

TERRIS, B. D.; THOMSON, T. Nanofabricated and self-assembled magnetic structures as data storage media. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.38, n.12, 2005

THOREK, D. L. J.; CHEN, A. K.; CZUPRYNA, J.; TSOURKAS, A. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles probes for molecular imaging. **Annals of Biomedical Engineering**, v.34, n.1, p.23-38, 2006.

THUDI, L.; JASTI, L. S.; SWARNALAHTA, Y.; FADNAVIS, N. W.; MULANI, K.; DEOKAR, S.; PONRATHAN, S. Enzyme immobilization on epoxy supports in reverse micellar media: prevention of enzyme denaturation. **Journal of Molecular Biocatalysis B**, v.74, p.54-62, 2012.

TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, F. Biocatalysis. Catalysis Letters, v.145, p.309-345, 2015.

TORRES, P.; REYES-DUARTE, D.; LOPEZ-CORTES, N.; FERRER, M.; BALLESTEROS, A.; PLOU, F. J. Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on diffrent carriers. **Process Biochemistry**, v.43, p.145–153, 2008.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Immobilization of *Brukholderia sp.* lipase on a ferric nanocomposite for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v.158, p.112–119, 2012.

VAN EWIJK, G. A.; VROEGE, G. J.; PHILIPSE, A. P. Convenient preparation methods for magnetic colloids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.201, n.1-3, p.31-33, 1999.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic, v.9, p.113-148, 2000.

VITOLO, M. Imobilização de enzimas. In: LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia industrial**: processos fermentativos e enzimáticos. São Paulo: Editora Edgard Blücher, 2001, v.3, cap.18, p.391-403.

WEI, Y.; HAN, B.; HU, X.; LIN, Y.; WANG, X.; DENG, X. Synthesis of Fe_3O_4 nanoparticles and their magnetic properties. **Procedia Engineering**, v.27, p.632-637, 2012.

WYKROTA, R. **Poli(estireno-divinilbenzeno) funcionalizado na regeneração de óleo mineral isolante envelhecido: Remoção de produtos de oxidação**. 97f., 2004. Tese (Mestrado em Ciências), Universidade Federal do Paraná, 2004.

WU, Y.; WANG, Y; LUO, G.; DAI, Y. In situ preparation of magnetic Fe₃O₄-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. **Bioresource Technology**, v.100, n.14, p.3459-3464, 2009.

XIE, K.; YU, Y.; SHI, Y. Synthesis and characterization of cellulose/silica hybrid materials with chemical crosslinking. **Carbohydrate Polymers**, v.78, p.799-805, 2009.

XIE, W.; WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transestrification of soybean oil. **Biomass Bioenergy**, v.36, p.373–380, 2012.

YAMAURA, M.; CAMILO, R. L.; SAMPAIO, L. C. MACEDO, M. A.; NAKAMURA, M.; TOMA, H. E. Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilanecoated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.279, n.2-3, p.210-217, 2004.

YONG, Y.; BAI, Y.; LI, Y.; LIN, L.; CUI, Y.; XIA, C. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. **Process Biochemistry**, v.43, p.1179-1185, 2008.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas Imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2004. Cap. 4, 2004.

ZENG, L.; LUO, K.; GONG, Y. Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.38, p.24-30, 2006.

ZHANG, B.; WENG, Y.; XU, H.; MAO, Z. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.93, p.61-70, 2012.

ZHAO, F.; ZHANG, B.; FENG, L. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Materials Letters**, v.68, p.112-114, 2012.

APENDICE







SO-repetição







S2



1200

1100



- Butanol

S4

