

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

PATRÍCIA DANIELA MIJONE

Imobilização de lipase em suporte magnetizado: desenvolvimento de técnicas
de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos

Lorena-SP

2014

PATRICIA DANIELA MIJONE

Imobilização de lipase em suporte magnetizado: desenvolvimento de técnicas de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos

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: Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Edição reimpressa e corrigida

Lorena-SP

Abril, 2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na Publicação
Biblioteca “Cel. Luiz Sylvio Teixeira Leite”
Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo

Mijone, Patrícia Daniela

Imobilização de lipase em suporte magnetizado: desenvolvimento de técnicas de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos./ Patrícia Daniela Mijone– Ed reimp. e corr.- 2014.

92p: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências – Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração: Processos Catalíticos e Biocatalíticos.) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2014.

Orientadora: Heizir Ferreira de Castro.

1. Partículas magnéticas. 2. Imobilização. 3. Lipase 4. Óleo de coco. 5. Biodiesel. I. Título. II. Heizir, Ferreira de Castro, Orient.

577.152-CDU

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que mais me incentivaram e ajudaram a concluir esta importante etapa de minha vida.

A minha amada mãe, que faz com que as flores se abram a olhos vistos, pelo constante apoio e respeito em minhas escolhas, ao meu pai pela boa educação, sinceridade e ajuda e a minha irmã Ana Paula, pelos conselhos, parceria, animação, amor e compreensão nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

A Deus por guiar-me sempre em meus caminhos e permitir-me conseguir chegar até aqui.

A orientadora Prof^a. Heizir F. de Castro pela oportunidade, dedicação, atenção, paciência, ensinamentos, valiosos conselhos que contribuíram significativamente para o aprimoramento deste trabalho e excelente orientação que servirá como alicerce para meu futuro profissional.

A minha querida família, meus amados pais João e Divina e minha querida irmã Ana Paula, pelo amor, respeito, paciência e compreensão nas horas mais difíceis.

Aos amigos da AmstedMaxion pelo carinho, incentivo e apoio incondicional em minha vida profissional ao longo de nossa convivência.

Ao Prof. Pedro Carlos de Oliveira pela ajuda, paciência e companheirismo.

À Profa. Dr^a Jayne Carlos de Souza Barboza pela amizade, pelo acolhimento e disponibilidade durante minha vida acadêmica sempre que solicitada.

As doutoras Larissa de Freitas Teixeira e Patrícia Caroline Molgero Da Rós, pelos conselhos e incessante ajuda nas principais dificuldades encontradas neste trabalho.

A querida Ana Karine pelo apoio, pela alegria e ajuda incondicional.

Aos amigos do laboratório de biocatálise: Ariela, Grazielle, Weriton, Leticia, Renata e Daniel, pela boa convivência, amizade e suporte na execução deste projeto.

As minhas amigas e meus amigos pelo carinho e convivência: Natalia Gusmão, Verônica Oliveira, Débora Meira, Clara Monteiro, Camila Araújo, Andre Souza, Mario Almeida, Juliana Custódio, Gabriela Ventura e em especial ao Felipe Biazotto e a Lily pelo convívio incentivo e amor que me proporciona.

À Escola de Engenharia de Lorena incluindo todos os colegas, professores e seus funcionários que contribuíram de forma direta e indiretamente em minha formação durante estes anos.

Registro meu agradecimento a todos que contribuíram para este texto, seja pelas ideias, atos ou pela contribuição com o trabalho.

“... Porque sou eu que conheço os planos que tenho para vocês', diz o Senhor, planos de fazê-los prosperar e não de causar dano, planos de dar a vocês esperança e um futuro... “

A BÍBLIA SAGRADA – JEREMIAS 29:11

RESUMO

MIJONE, P.D. **Imobilização de lipase em suporte magnetizado**: desenvolvimento de técnicas de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos. 2014, 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2014.

O presente projeto teve como objetivo sintetizar matrizes magnetizadas para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* para aplicação na síntese de ésteres alquílicos. Foram testadas duas metodologias para síntese de compósitos formados por óxidos magnéticos dispersos em matriz de sílica, a saber: a) matriz polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) dopada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃ e b) matriz polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) sintetizada com incorporação de Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃. As matrizes polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) e partículas de Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃ foram usadas como controles. As características texturais e morfológicas das matrizes magnéticas e não magnética foram determinadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), difratograma de raios-X, espectroscopia no infravermelho (IV) e análise de tamanho de poros (BET). As partículas de magnetita (Fe₃O₄) e maghemita (γ Fe₂O₃) apresentaram comportamento superparamagnético. A lipase de *B. cepacia* foi imobilizada nas quatro matrizes (magnetizada e não magnetizada) por adsorção física e ligação covalente e os rendimentos de imobilização similares obtidos sugerem que as partículas de ferro não interferiram na interação enzima-suporte. Entretanto, os parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}) determinados indicaram que a lipase imobilizada nos suportes magnetizados tem menor afinidade pelo substrato. Os valores determinados de K_m e V_{max} da lipase de *B. cepacia* na forma livre ($K_m = 400 \pm 32$ mM e $V_{max} = 16019 \pm 749$ U g^{-1}) mostraram que independente do suporte a imobilização reduziu aproximadamente 50% da afinidade da enzima pelo substrato. Os derivados imobilizados obtidos por ligação covalente foram selecionados para mediar reações de transesterificação do óleo de coco pela rota etanólica e demonstraram eficiente desempenho, fornecendo conversões praticamente totais em ésteres de etila entre 72-96h. A menor velocidade de reação foi verificada para a lipase imobilizada em partículas de Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃, provavelmente devido à interferência negativa do óxido de ferro que reduziu a afinidade da enzima pelo substrato, corroborando com os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} . As amostras purificadas apresentaram propriedades que atendem às especificações exigidas pela Agência Nacional de Petróleo (ANP) para uso como biocombustível, incluindo: pureza elevada em ésteres etílicos (mínimo 96%), densidade (873-876 kg m^{-3}) e viscosidade cinemática (3,76-3,93 mm²s⁻¹).

Palavras-chave: Partículas magnéticas. Imobilização. Lipase. Óleo de coco. Biodiesel.

ABSTRACT

MIJONE, P. D. **Immobilization of lipase on magnetized support:** development of immobilization techniques and application in the synthesis of alkyl esters. 2014. 92p Dissertation (Master of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/SP, 2014.

The objective of this work was to synthesize magnetic matrices for immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase to be used in the synthesis of alkyl esters. Two methods for the synthesis of the magnetic composites dispersed in silica matrices were tested: a) matrix polysiloxane-polyvinyl alcohol (SiO₂-PVA) coating with Fe₃O₄ and γ Fe₂O₃ and b) matrix polysiloxane-polyvinyl alcohol (SiO₂-PVA) synthesized with incorporation of Fe₃O₄ and γ Fe₂O₃. The matrix polysiloxane-polyvinyl alcohol (SiO₂-PVA) and the composite Fe₃O₄ and γ Fe₂O₃ particles were used as controls. The morphological and textural characteristics of the magnetic and nonmagnetic matrices were determined by analysis of pore size (BET), scanning electron microscopy (MEV), X-ray diffraction and infrared spectroscopy (IV). The magnetite (Fe₃O₄) and maghemite (γ Fe₂O₃) particles showed super paramagnetic behavior. The lipase *B. cepacia* was immobilized in the matrices (magnetized and non-magnetized) by physical adsorption and covalent attachment and the similar immobilization yields obtained suggest that the iron particles did not affect the enzyme-support interaction. However, the determined kinetic parameters (K_m and V_{max}) indicated that the lipase immobilized in both magnetized SiO₂-PVA matrices had lower affinity for the substrate. The K_m and V_{max} values determined for free lipase ($K_m = 400 \pm 32$ mM and $V_{max} = 16019 \pm 749$ U g⁻¹), showed that independently of the immobilization support the affinity of the enzyme for the substrate was reduced by 50%. The immobilized derivatives prepared by covalent attachment were used to mediate the transesterification reactions of coconut oil by ethanolysis route. All immobilized derivatives were efficient in the ethanolysis of coconut oil attaining total conversion to ethyl esters in 72 hours, with the exception of the immobilized lipase on Fe₃O₄ and γ Fe₂O₃ particles, which provided total conversion in 96 h, probably due to the negative influence of the iron particles on the enzyme. The purified product samples (biodiesel) were essentially odorless and translucent appearance. The purity of the ethyl esters was high. In addition, other properties such as density (873-876 kg m⁻³) and viscosity (3.76-3.93 mm² s⁻¹) meet the specifications required by the National Petroleum Agency (ANP) to be used as a biofuel.

Keywords: Magnetic particles. Immobilization. Lipase. Coconut oil. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Reações catalisadas pelas lipases.	23
Figura 3.2. Classificação dos métodos para imobilização de enzimas.	26
Figura 3.3. Curva de histerese e seus parâmetros.	40
Figura 3.4. Aplicação de campo magnético em partículas superparamagnéticas.	43
Figura 3.5. Estrutura cristalina da magnetita: a) sítio tetrédrico, b) sítio octaédrico, c) célula unitária, d) estrutura de dois cubos inferiores indicados em c.	44
Figura 3.6. Corte longitudinal do coco, com suas partes.	52
Figura 3.8. Representação esquemática da reação global de transesterificação.	54
Figura 3.9. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.	54
Figura 4.1. Fluxo do processo de co- precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3}	62
Figura 5.1. Espectros na região do infravermelho da matriz SiO_2 -PVA (a) linha laranja, matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 (b) linha azul, SiO_2 -PVA sintetizada com Fe_3O_4 e γFe_2O_3 (c) linha vinho e partículas de Fe_3O_4 e γFe_2O_3 (d) linha preta.	71
Figura 5.2. Difractometria de Raios X da matriz SiO_2 -PVA (a) linha laranja, matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 (b) linha azul, SiO_2 -PVA sintetizada com Fe_3O_4 e γFe_2O_3 (c) linha vinho e partículas de Fe_3O_4 e γFe_2O_3 (d) linha preta.	73
Figura 5.3. Curvas de difração de raios X: (a) ficha catalográfica da magnetita (JCPDS#19-0629), semelhante à maghemita.	73
Figura 5.4 (a-d). Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.	74
Figura 5.5. Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de coco com etanol, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em diferentes suportes: (a) matriz SiO_2 -PVA, (b) matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 e γFe_2O_3 , (c) matriz SiO_2 -PVA sintetizada com Fe_3O_4 e γFe_2O_3 e (d) partículas de Fe_3O_4 e γFe_2O_3	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Características, vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.	26
Tabela 3.2. Classificação dos suportes de acordo com a composição	30
Tabela 3.3. Características das principais culturas oleaginosas no Brasil.	50
Tabela 3.4. Produção e área colhida dos principais países produtores de coco, em 2008..	51
Tabela 3.5. Área plantada com coqueiro e produção de coco nas regiões do Brasil	51
Tabela 3.6. Composição em ácidos graxos do óleo de coco.....	53
Tabela 3.7. Materiais magnéticos utilizados como suporte de imobilização de lipases e com a finalidade de produzir biodiesel	57
Tabela 4.1. Equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.	60
Tabela 5.1. Propriedades texturais das matrizes magnetizadas e não magnetizada.....	70
Tabela 5.2. Valores de densidade cristalina dos diferentes suportes.	70
Tabela 5.3. Parâmetros de imobilização da lipase <i>B. cepacia</i> em suportes magnetizados e não magnetizado por adsorção física e ligação covalente	76
Tabela 5.4. Valores de K_m e V_{max} obtidos a partir dos valores de atividade hidrolítica em função da concentração de substrato.	77
Tabela 5.5. Formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de coco com etanol, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em diferentes suportes: matriz SiO_2 -PVA, matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 e γFe_2O_3 , matriz SiO_2 -PVA sintetizada com Fe_3O_4 e γFe_2O_3 e partículas de Fe_3O_4 e γFe_2O_3	79
Tabela 5.6. Propriedades das amostras de biodiesel obtidas da reação de transesterificação do óleo de coco com etanol, catalisada pela lipase <i>B. cepacia</i> imobilizada em diferentes suportes.	80

LISTA DE SIGLAS

PVA	Álcool polivinílico
PEG	Polietilenoglicol
SiO₂-PVA	Polissiloxano-Álcool Polivinílico
TEOS	Tetraetilortossilicato
ANP	Agência Nacional de petróleo, Gás natural e Biocombustível
IV	Espectroscopia no Infravermelho
B.E.T	Brunauer-Emmett-Teller

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVO.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Lipases	21
3.2. Técnicas de imobilização de enzimas	24
3.2.1. Adsorção física	27
3.2.2. Ligação covalente	28
3.2.3. Encapsulação	29
3.3. Suportes para imobilização	29
3.3.1. Suportes híbridos	32
3.3.2. Suportes magnéticos	35
3.4. Magnetismo	37
3.4.1. Classificação dos materiais quanto ao magnetismo.....	38
3.4.2. Superparamagnetismo de partículas magnéticas	41
3.4.3. Partículas de Fe ₃ O ₄	43
3.5. Métodos de obtenção das partículas magnéticas	45
3.5.1. Decomposição térmica.....	45
3.5.2. Microemulsão	46
3.5.3. Método de co-precipitação.....	46
3.6. Biodiesel	48
3.6.1. Matérias-primas para produção de biodiesel	50
3.6.2. Produção de biodiesel	53
3.6.3. Catalisadores para síntese de biodiesel	55
4. MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1. Materiais	59
4.1.1. Enzima	59
4.1.2. Materiais de partida	59
4.1.3. Suporte híbrido SiO ₂ -PVA.....	59
4.1.4 . Suportes Magnéticos.....	59
4.1.5. Outros reagentes	59
4.2. Equipamentos.....	60
4.3. Metodologia Experimental	60
4.3.1 Síntese do suporte híbrido.....	60
4.3.2. Síntese da magnetita: Processo de co-precipitação dos ions Fe ⁺² e Fe ⁺³	61
4.3.3. Magnetização do suporte híbrido: Dopagem do suporte (SiO ₂ -PVA).....	63
4.3.4. Incorporação das partículas magnéticas na síntese do suporte híbrido	63
4.3.5. Ativação dos suportes	63
4.3.6. Imobilização de lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> nos suportes sintetizados	63
4.3.7. Síntese de ésteres alquílicos.....	64
4.3.8. Purificação dos ésteres.....	64

4.4. Métodos de Análise	65
4.4.1. Dosagem da umidade.....	65
4.4.2. Área superficial e volume de poros específicos.....	65
4.4.3. Difração de Raios-X (DRX)	66
4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	66
4.4.5. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV).....	66
4.4.6. Determinação da densidade cristalina dos suportes.....	67
4.4.7. Determinação da atividade enzimática	67
4.4.8. Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada	68
4.4.9. Determinação dos ésteres de etila	68
4.4.10. Densidade dos ésteres de etila	68
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
5.1. Caracterização dos suportes magnetizados.....	69
5.1.1. Propriedades texturais dos suportes de imobilização	69
5.1.2. Densidade Cristalina	70
5.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	71
5.1.4. Difração de Raios-X	72
5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura	74
5.2. Seleção do método de imobilização.....	75
5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos	76
5.4. Síntese de ésteres de etila por transesterificação	78
6. CONCLUSÕES.....	81
REFERÊNCIAS.....	83

1. INTRODUÇÃO

A utilização de enzimas como catalisadores evoluiu expressivamente nos últimos anos. Características tais como: alta eficiência catalítica, alto grau de especificidade e a capacidade de acelerar reações químicas específicas sem a formação de subprodutos indesejáveis são aspectos que contribuem para o emprego destes biocatalisadores em todos os campos da indústria (DICOSIMO et al., 2013; POLSHETTIWART et al., 2011).

Entre os processos químicos de maior interesse industrial estão às reações catalisadas pelas lipases, as quais representam aproximadamente 20% das biotransformações realizadas atualmente. O potencial de uso industrial das lipase é destacado pela versatilidade em processos hidrolíticos e de síntese (DE CASTRO et al., 2010). A habilidade catalítica das lipases tem sido aplicada na modificação de óleos e gorduras e síntese de compostos orgânicos (RIBEIRO et al., 2011; ADLERCREUTZ, 2013).

Idealmente sistemas catalisados por lipases devem ser tratados caso a caso e generalizações devem ser praticadas com cautela. Os maiores obstáculos na competição deste processo com a prática corrente da síntese química são: o alto custo dos biocatalisadores e sua baixa estabilidade térmica. Uma maneira de superar tais limitações é proteger a configuração nativa da enzima por meio de sua imobilização em suportes sólidos, o que resulta em efeito benéfico na sua estabilidade, em função das interações físicas e químicas entre o suporte e as moléculas da enzima (ZANIN; MORAES, 2004). A imobilização, também auxilia na dispersão homogênea da enzima no meio, o que é essencial, para a condução de reações enzimáticas (DE CASTRO et al., 2008).

A imobilização refere-se à localização ou confinamento da enzima. A seleção do método de imobilização deve ser baseada em determinados parâmetros como atividade global do derivado imobilizado, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (MALCATA et al, 1990; ZANIN; MORAES, 2004).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, tem sido estudada para a imobilização de enzimas (BALCÃO et al., 1996; VILLENEUVE et al., 2000; ZANIN; MORAES, 2004). No entanto, resultados mais eficientes são obtidos pela utilização de

suportes industrializados, de alto custo e de reagentes para a ativação dos suportes, também caros. Em função disso, o estudo sistemático de imobilização de enzimas em matrizes alternativas aumentou nos últimos anos. Entre os suportes testados merecem destaque quitina e quitosana (GOMES et al., 2004; PEREIRA et al., 2001); resíduos agroindustriais como celullignina (PEREZ et al., 2007) e matrizes híbridas de materiais orgânicos e inorgânicos, tais como sílica-álcool polivinílico (PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008), sílica-quitosana (SIMÕES et al., 2011) e sílica-celulose (XIE et al., 2009).

A matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) tem sido testada com sucesso para imobilização de diferentes fontes de lipase, incluindo pâncreas de porco (PAULA et al., 2007), *Candida rugosa* (PAULA et al., 2008), *Burkholderia cepacia* (FREITAS et al., 2009; DA RÓS et al., 2010), *Rhizopus oryzae* (PAULA et al., 2008), *Pseudomonas fluorescens* (MOREIRA et al., 2007; SANTOS et al., 2008) e *Penicillium camemberti* (MENDES et al., 2011). Outra característica relevante desses sistemas imobilizados é sua adequação para aplicação em reatores de leito fixo (FREITAS et al., 2010; DORS et al., 2012; COSTA SILVA et al., 2013).

Neste contexto, o presente projeto teve como meta obter derivados imobilizados de lipase microbiana em suporte híbrido SiO₂-PVA magnetizado para desenvolvimento de técnicas de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos. Para tal finalidade, foi investigada a técnica de magnetização do suporte híbrido por co-precipitação, considerando como reação básica a co-precipitação de Fe⁺² com Fe⁺³ em NaOH. O trabalho experimental foi direcionado para o aprimoramento dos procedimentos de imobilização da lipase em partículas magnetizadas, visando à obtenção de biocatalisadores imobilizados ativos na condução de reações de biotransformação reversíveis, como a produção de ésteres de etila (biodiesel).

2. OBJETIVO

O objetivo deste projeto foi a produção de amostras ativas e estáveis de lipase imobilizada em suportes magnetizados, tornando possível sua aplicação em biotransformações de compostos de interesse para aplicação na tecnologia de óleos e gorduras. Levando em consideração estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas:

- Preparo dos suportes magnetizados por diferentes técnicas e caracterização das propriedades texturais e morfológicas;
- Imobilização da lipase nos suportes preparados e caracterização da enzima imobilizada quanto aos parâmetros cinéticos;
- Utilização dos derivados imobilizados em reações de modificação de óleos vegetais, tomando como modelo de estudo a transesterificação de óleos vegetais láuricos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na revisão bibliográfica são abordados os principais temas relacionados com o trabalho, iniciando com informações sobre lipase e técnicas de imobilização em diferentes suportes. Em seguida foi dado enfoque sobre a aplicação do magnetismo em suportes para imobilização de enzimas, finalizando com a síntese de biodiesel e as matérias-primas envolvidas no processo.

3.1. Lipases

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de ligações éster-carboxílicas de acilgliceróis para liberar ácidos orgânicos e glicerol, podendo a reação inversa (síntese) ocorrer em ambientes pobres em água (DE CASTRO et al., 2004).

As lipases são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). Inicialmente, eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998; DE CASTRO et al., 2004). Em função do baixo rendimento do processo fermentativo, as lipases microbianas tinham também um custo bem mais elevado quando comparado com outras hidrolases, como proteases e carboxilases. Entretanto, os recentes avanços registrados na tecnologia do DNA, têm permitido aos fabricantes de enzimas colocar no mercado lipases microbianas com uma atividade elevada a um custo mais acessível (HASAN et al., 2009).

As enzimas produzidas por fermentação microbiana, são em sua maioria extracelulares, fato que facilita os processos de extração e purificação e conferindo maior estabilidade. A produção de enzimas por via microbiana permite fácil controle das condições de cultivo e pode ser realizada em escala industrial com baixos custos. O rápido crescimento celular é um outro fator importante na produção de enzimas dessa fonte. As lipases microbianas são produzidas por diversas indústrias, como Novozymes, Amano, Gist Brocades, entre outras. Uma publicação sobre a disponibilidade comercial de lipases listou enzimas de 34 diferentes fontes, incluindo 18 a partir de fungos e 7 de bactérias (REETZ, 2006).

Dependendo da fonte, as lipases podem ter massa molecular variando entre 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até

70 °C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40 °C (VULFSON, 1994).

A importância da lipase está associada a sua capacidade de atuar em ambiente de baixo teor de água (solvente orgânico) apresentam uma capacidade catalítica diversificada, alta tolerância a diferentes fatores do ambiente, como ampla faixa de pH, temperatura e solventes orgânicos e por isso tornam-se muito atrativas para a biotecnologia (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

A ação catalítica das lipases é bastante complexa e a estrutura da enzima ao redor do sítio ativo varia significativamente de uma lipase para outra. Entretanto, existem pontos estruturais que são comuns para todas as lipases, como por exemplo, a lipase de *Burkholderia cepacia*, que apresenta um sítio catalítico composto por resíduos de serina, histidina e aspartato (ou glutamato), constituído na tríade catalítica, que se repete em todas as estruturas e frequentemente protegida por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” (JAEGER et al., 1998).

Dessa forma, para que a catálise tenha início é necessário que ocorra a “ativação interfacial”. Essa ativação pode ser explicada por meio da estrutura tridimensional da lipase. Quando há ligação do substrato na superfície da enzima, a tampa move-se, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, com o sítio ativo agora acessível ao substrato e, ao mesmo tempo, expondo uma larga superfície hidrofóbica que facilita a ligação da lipase ao substrato (DE CASTRO et al., 2004).

As lipases têm um importante papel na indústria química, devido a sua químio-, regio- e estereo-especificidade que não pode ser alcançada em muitos casos, por qualquer outro tipo de catalisador (MACARIO et al., 2009). As lipases são eficientes como catalisadores de diversas reações, mostradas na Figura 3.1 (DE CASTRO et al., 2004). Além de clivar as ligações éster de triacilgliceróis com o consumo de moléculas de água (hidrólise), as lipases são também capazes de catalisar a reação reversa sob condições microaquosas, como por exemplo, a formação de ligações éster, a partir de um álcool e ácido carboxílico (YAHYA et al., 1998; DE CASTRO et al., 2004). Estes dois processos básicos podem ser combinados numa sequencia lógica para resultar em reações de interesterificação (acidólise, alcoólise e transesterificação), dependendo dos reagentes de partida empregados (BALCÃO et al., 1996). Lipases de diferentes fontes são capazes de

catalisar a mesma reação, embora possam diferir no desempenho sob as mesmas condições reacionais (YAHYA et al., 1998).

As lipases estão entre as enzimas promissoras para aplicações na produção de fármacos, cosméticos, alimentos, perfumaria, diagnósticos médicos, síntese de compostos opticamente ativos, produção de aromas e fragrâncias e modificações de lipídeos (SHARMA et al., 2001). Atualmente, a utilização de lipases para a síntese de biodiesel (RIBEIRO et al., 2011) também representa um campo de vasta aplicação para estas enzimas, sendo essa aplicação objeto do presente projeto.

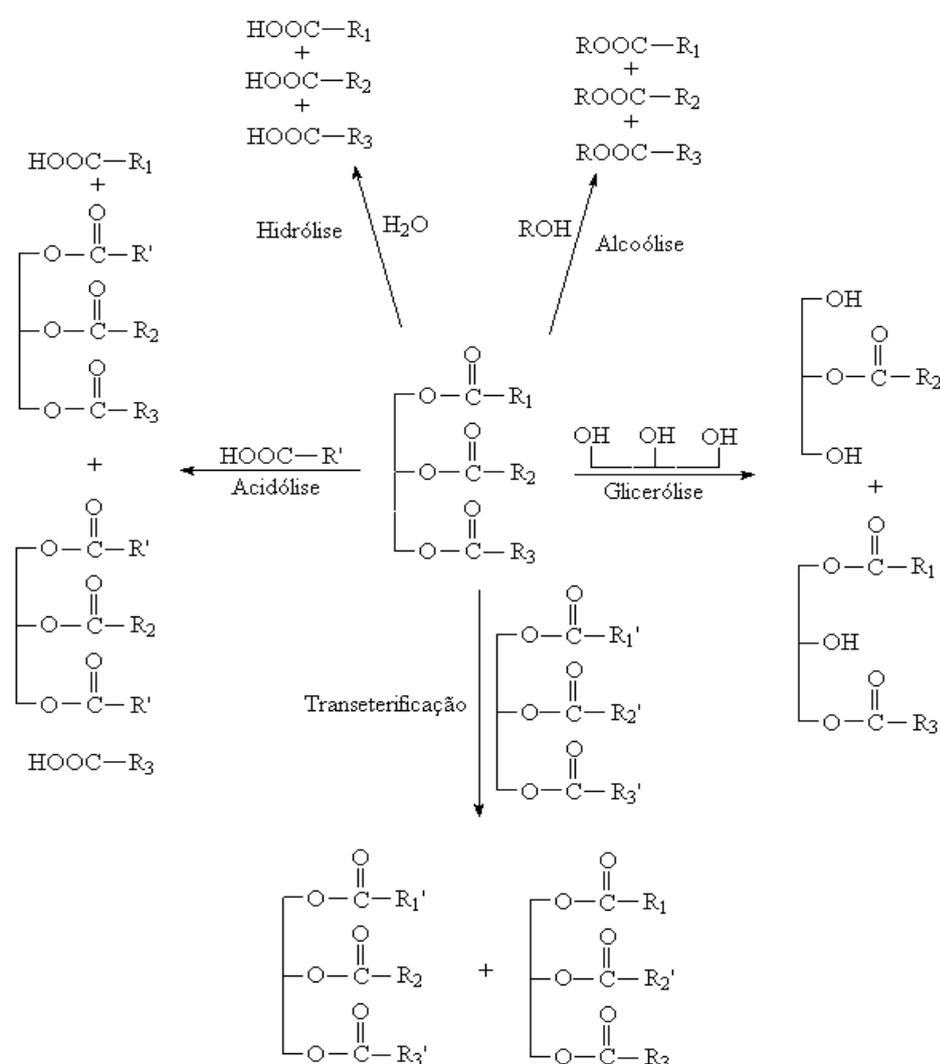


Figura 3.1. Reações catalisadas pelas lipases.

Fonte: DE CASTRO et al. (2004).

Entretanto, a ampla versatilidade do uso de lipases em diferentes aplicações torna-se mais atraente quando são empregadas na forma imobilizada, possibilitando sua reutilização e reduzindo o custo do processo. De fato, as diversas vantagens associadas ao uso de enzimas imobilizadas quando comparado ao emprego dos biocatalisadores na forma livre em processos de interesse industrial têm sido relatadas por diversos autores (LIU et al., 2005; RIBEIRO et al., 2011; ADLERCREUTZ, 2013). A solubilidade de muitas enzimas em sistemas aquosos, por exemplo, dificulta sua recuperação do meio reacional para posterior reutilização. Além disso, as dificuldades para obtenção de uma suspensão homogênea em meios hidrofóbicos limitam o aproveitamento da potencialidade destes biocatalisadores. Estes problemas podem ser contornados com a imobilização das enzimas em suportes sólidos.

Sistemas imobilizados são também adequados para uso em processos contínuos e o aumento da estabilidade da enzima em diferentes condições reacionais resulta frequentemente em maiores taxas de conversão de substrato em produto (LIU et al., 2005). É importante destacar, entretanto, que as características da enzima imobilizada e, conseqüentemente, seu desempenho em processos industriais, são fortemente influenciadas pela técnica e pelo tipo de suporte empregado.

3.2. Técnicas de imobilização de enzimas

O termo "enzimas imobilizadas" refere-se a "enzimas fisicamente confinadas ou localizadas em uma determinada região de espaço definida, com retenção da sua atividade catalítica, e que pode ser usada repetidamente e de forma contínua" (GUISAN, 2006).

O principal interesse em imobilizar enzimas é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre e poder utilizar repetidamente e continuamente a enzima imobilizada. Além disso, alterações estruturais, bem como modificações no sítio ativo devem ser evitadas (ZANIN; MORAES, 2004; ADLERCREUTZ, 2013).

Outro diferencial do processo de imobilização de enzimas é a aplicação em reatores com maior controle do processo, podendo ser usadas elevadas concentrações, permitindo a sua reutilização sem perda significativa da sua atividade catalítica (GUISÁN, 2006). As limitações deste processo são: alteração da conformação nativa da enzima, custo do suporte e perda de atividade durante o processo de imobilização (GUISÁN, 2006).

A imobilização de enzimas oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um produto enzimático imobilizado variam de acordo com a aplicação, incluindo: (i) a manutenção da atividade catalítica por um maior período de tempo; (ii) possibilidade de operação contínua do processo, com maior facilidade de controle; (iii) facilidade de separação do produto final; (iv) em alguns casos, ocorre modificação favorável das propriedades catalíticas da enzima como, por exemplo: maior estabilidade ao pH e à temperatura, entre outros; (v) facilidade de interrupção da reação, em um nível desejado, pela remoção da enzima, caso o processo seja batelada, ou do ajuste do tempo de residência caso seja usado um reator contínuo (DE CASTRO et al., 2008; HANEFELD et al., 2009).

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas estas enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e de baixo custo que resulte numa enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (ZANIN; MORAES, 2004).

Enzimas podem ser imobilizadas de muitas maneiras, isto é, podem ser imersas em gel ou microcápsulas; podem ser adsorvidas em materiais insolúveis como resinas de troca iônica; podem ser copolimerizadas com algum monômero; podem se ligar a uma matriz polimérica insolúvel e ainda por ligações covalentes (VILLENEUVE et al., 2000; DE CASTRO et al., 2008).

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos utilizados, é possível fazer-se generalizações que permitem uma primeira seleção do método de imobilização.

A seleção do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como atividade global do derivado, características de regeneração e inativação, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada (MALCATA et al., 1990).

Os principais métodos de imobilização são apresentados na Figura 3.2 e as principais características, vantagens e desvantagens de cada um deles são apresentadas na Tabela 3.1.

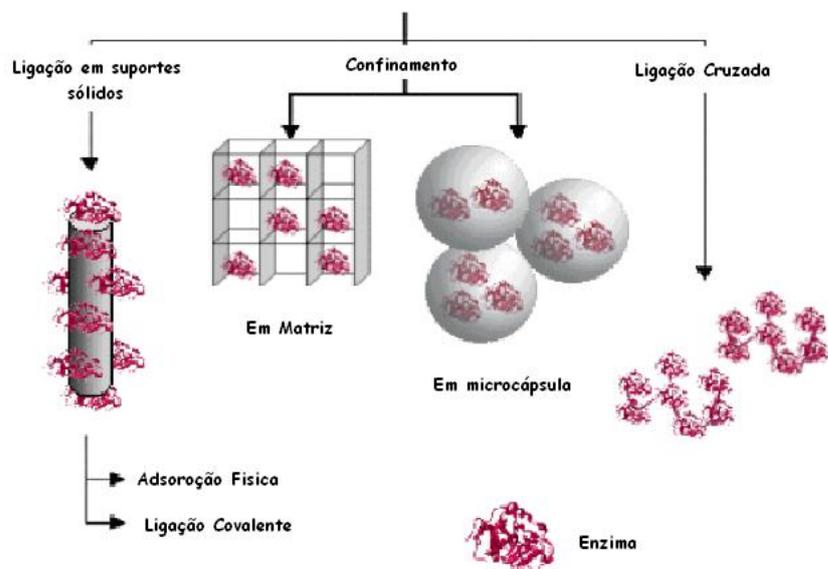


Figura 3.2. Classificação dos métodos para imobilização de enzimas.
 Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004 (adaptado).

Tabela 3.1. Características, vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização de enzimas.

Método	Característica	Vantagem	Desvantagem
<i>Adsorção Física</i>	A enzima é imobilizada sobre um suporte sólido por ligações fracas: Forças físicas (van der Waals) ou por interações hidrofóbicas, pontes de hidrogênio e ligação iônica	Simplicidade; Pouca mudança na conformação do catalisador;	Fragilidade da ligação Dessorção do catalisador por flutuações de pH, forças iônicas, temperatura
<i>Ligação Covalente</i>	Ligação covalente entre a enzima e o suporte com a utilização de um agente de ativação.	Ligação estável entre a enzima e o suporte, evitando o fenômeno de dessorção;	Preparação mais difícil e de maior custo
<i>Ligação Cruzada</i>	Ligações cruzadas numa matriz, contendo a enzima e usando vários agentes bifuncionais.	Enzimas fortemente ligadas ao suporte: difícil perda	Perda de atividade enzimática durante a preparação; Não é possível a regeneração do suporte
<i>Encapsulação: Matriz ou Microcápsula</i>	Inclusão da enzima em matrizes poliméricas ou em micro-cápsulas	Enzima não interage quimicamente com o suporte, evitando desnaturação	Instabilidade em presença de íons com cargas opostas

Fonte: DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; ZANIN; MORAES, 2004.

Quando a imobilização da enzima envolve uma reação química (ligação cruzada ou ligação covalente), as condições de imobilização devem ser suaves para evitar a inativação da enzima durante a reação química com o suporte. Porém, se a imobilização com ligação química for bem sucedida, obtém-se uma enzima imobilizada com alta estabilidade devido à forte ligação resultante. A ligação cruzada intermolecular, geralmente, não é adequada para aplicações industriais, devido à baixa estabilidade mecânica, enquanto a enzima ligada covalentemente em suportes orgânicos raramente pode ser regenerada e, portanto, é pouco atrativa para uso em grande escala (GUISÁN, 2006).

3.2.1. Adsorção física

O método de imobilização por adsorção ainda é o mais comum, pois se trata de um procedimento simples e envolve interações reversíveis entre a lipase e o suporte. A lipase é imobilizada em um suporte sólido por interações de van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras. O sucesso e a eficiência da adsorção de uma lipase em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da lipase a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros (ZANIN; MORAES, 2004; GUISAN, 2006; VILLENEUVE et al., 2000). Além disso, o suporte pode ser facilmente recuperado para uma sucessiva imobilização (JEGANNATHAN et al., 2008).

Nas reações conduzidas em meio orgânico não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte. Nestas condições, a enzima é insolúvel no meio apolar e a adsorção física pode ser um método bastante vantajoso (ADLERCREUTZ, 2013). Este método de imobilização é de baixo custo, pois não é necessária a ativação do suporte e permite fácil reuso do suporte após vários ciclos (ADLERCREUTZ, 2013).

A imobilização de lipases por adsorção normalmente é realizada em suportes hidrofóbicos, pois a enzima sofre ativação interfacial na presença de interface hidrofóbica e a região do sítio ativo interage por adsorção hidrofóbica com o suporte. Todas estas ligações são rompidas com facilidade pela variação do pH, da força iônica, da temperatura e da natureza do solvente, este é o fator responsável pela fragilidade apresentada por este tipo de sistema imobilizado. Para que o mesmo seja estável é indispensável que as condições de adsorção da enzima ao suporte sejam idênticas às do sistema reacional no qual se utilizará o sistema imobilizado (VILLENEUVE et al., 2000).

Caso a interação suporte/enzima seja de natureza essencialmente iônica, uma ligeira mudança do pH ou da força iônica do meio de reação será suficiente para causar a dessorção da proteína (TAN et al., 2010). Para otimizar a interação enzima/suporte é necessária a disponibilidade de uma grande área superficial, que pode ser conseguida escolhendo-se um suporte poroso ou, se utilizado um suporte de baixa porosidade, que o mesmo seja constituído por grânulos os menores possíveis.

O sucesso e a eficiência da adsorção de uma enzima em um suporte, que em geral é na superfície, dependem de vários parâmetros, tais como tamanho da proteína a ser adsorvida, área superficial do adsorvente e, principalmente, da porosidade e tamanho dos poros. O uso de suportes porosos é vantajoso porque a enzima é adsorvida no interior dos poros. A eficiência depende também da concentração da enzima. A quantidade de enzima adsorvida por quantidade do suporte aumenta com a concentração do biocatalisador, atingindo um patamar de saturação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

3.2.2. Ligação covalente

O estabelecimento da ligação suporte insolúvel/enzima ocorre entre os grupos reativos existentes no suporte e os grupos dos resíduos de aminoácidos localizados na estrutura da lipase, de preferência, em posições não estratégicas para a catálise. Deste modo, a liberação da lipase a partir do suporte é dificultada, se comparada a outros tipos de imobilização (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Neste método, a enzima é covalentemente ligada ao suporte pela reação entre grupos funcionais da proteína e grupos reativos do material ativado. Esta técnica não é comum como o método de adsorção física, mas apresenta a vantagem de evitar o fenômeno de dessorção. Neste caso, são envolvidos os resíduos de aminoácidos não essenciais à catálise enzimática e grupos reativos da superfície do suporte (DE CASTRO et al., 2008).

A interação entre o suporte e a enzima pode ser obtida por ligação direta entre os componentes ou por meio de uma ligação intercalada de comprimentos diferentes, denominado espaçador. A molécula do espaçador proporciona um grau de mobilidade superior à enzima imobilizada, de modo que a sua atividade pode, em certas circunstâncias, ser maior do que se estivesse diretamente unida ao suporte (ADLERCREUTZ, 2013).

O uso da ligação covalente para imobilizar enzimas possui vantagens como: a ligação forte entre a enzima e o suporte, a fácil interação enzima/substrato devido à localização superficial do catalisador, o aumento da termoestabilidade em decorrência da

forte interação com o suporte. Entretanto, há desvantagens apresentadas por este tipo de imobilização, tais como: susceptibilidade de estruturas ativas da macromolécula aos reagentes utilizados e/ou às tensões conformacionais impostas pela união ao suporte, redução da atividade catalítica devido à forte ligação existente entre o suporte e a enzima, dificuldade para recuperar o suporte utilizado neste processo (ZANIN; MORAES, 2004).

3.2.3. Encapsulação

Este método não tem sido amplamente estudado, talvez porque bons resultados têm sido obtidos utilizando a técnica de imobilização por adsorção. No entanto, a encapsulação pode proporcionar vantagens, tais como a reduzida dessorção da enzima (ADLERCREUTZ, 2013).

A encapsulação está fundamentada na diferença de tamanho entre a molécula do catalisador e do soluto, nas quais duas aproximações têm sido adotadas: (a) a formação de uma estrutura porosa na presença da enzima, envolvendo-a numa estrutura tridimensional, ou (b) o biocatalisador é retido em uma membrana porosa. Nestes casos a enzima tem sua mobilidade mantida, pois não são envolvidas ligações físicas ou químicas entre a enzima e o suporte. Consequentemente, somente substratos de baixa massa molecular podem ser empregados com este tipo de enzimas imobilizadas. Este método pode compreender a encapsulação em gel, fibras e a microencapsulação (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

O método de encapsulação em gel envolve a retenção da enzima no interior de uma matriz polimérica insolúvel ao meio reacional. A maioria dos métodos envolve a mistura do biocatalisador com um fluido precursor do gel e a lipase e gelificação por meio de polimerização ou precipitação. A enzima fica distribuída no interior da matriz. As matrizes preferidas, normalmente são as do tipo hidrogel, e podem ser obtidas nas mais variadas formas (ADLERCREUTZ, 2013).

3.3. Suportes para imobilização

Os principais componentes de um sistema imobilizado são a enzima, o suporte e o método de imobilização. Destes, com exceção da enzima, a maior contribuição para o bom desempenho do biocatalisador é dada pelo suporte. A Tabela 3.2 apresenta a classificação dos suportes de acordo com a composição.

Na seleção de um suporte para determinada aplicação, devem ser analisadas suas propriedades físicas e químicas, bem como aquelas relativas à possibilidade de regeneração do material. As características do suporte são de primordial importância na determinação do desempenho das lipases imobilizadas. Suportes com propriedades ideais incluem resistência física à compressão, hidrofiliabilidade, biocompatibilidade e disponibilidade de baixo custo, entre outros (GUISÁN, 2006).

Tabela 3.2. Classificação dos suportes de acordo com a composição

	Naturais	Sintéticos
<i>Suporte Orgânico</i>	polissacarídeos, proteínas, celulose, quitina, amido, colágeno, albumina, gelatina, seda	poliestireno, poliacrilatos, polivinilos, nylon
	Minerais	Fabricados
<i>Suporte Inorgânico</i>	areia, bentonita, pedra-pomes	vidro, sílica, cerâmicas, alumino silicatos, óxidos metálicos

Fonte: ZANIN; MORAES, 2004.

Os materiais não-porosos eliminam a resistência de massa interna, mas apresentam baixa área superficial disponível à ligação da enzima. Este problema pode ser parcialmente superado pela utilização de partículas finas ou fibras, porém, outras dificuldades surgem quando se utilizam partículas muito finas, como por exemplo, alta queda de pressão e baixas vazões para operação em reatores operando em contínuo (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os suportes porosos apresentam grande área superficial interna disponível para a imobilização da enzima que neste caso fica protegida das condições de turbulência externa. Como a maior parte da área disponível para a imobilização está na estrutura interna, na utilização deste suporte, deve-se atentar para que o diâmetro do poro seja suficientemente grande para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato (GUISÁN, 2006).

Os polímeros naturais e sintéticos são uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinadas para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis não causando danos ao meio ambiente (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Os suportes de imobilização disponíveis comercialmente incluem: agarose, celulose, dextrana, polímeros e sílicas. Existe também uma série de matrizes híbridas baseadas nesses materiais como agarose-acrilamida e sílica recoberta com polímeros. Entre esses, os materiais inorgânicos são considerados excelentes suportes para a imobilização de enzimas e apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como: elevada resistência mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de microrganismos, sendo fácil sua regeneração por processo de pirólise. Além disso, materiais inorgânicos não apresentam modificação na estrutura em uma larga faixa de pressão, temperatura e pH. As características destes suportes são extremamente importantes e têm um papel definitivo na escolha do suporte apropriado para a imobilização da enzima (MALCATA et al., 1990).

Muitos materiais inorgânicos podem ser fabricados na forma de corpos porosos rígidos e mecanicamente resistentes. Esses materiais têm sido usados há muito tempo na indústria química e possuem muitas propriedades necessárias aos suportes para imobilização de enzimas. Embora muitos materiais inorgânicos tenham características adsorptivas adequadas suas propriedades físicas e hidráulicas geralmente requerem que sejam produzidos ou modificados especificamente para a imobilização. Dessa forma, vários suportes foram desenvolvidos, de modo a comportar a enzima e os substratos de alta massa molecular, geralmente presentes em reações enzimáticas (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, têm sido investigado para efetuar imobilização de lipases (VILLENEUVE et al., 2000). Alguns materiais citados na literatura como suportes para a imobilização de lipases são: polímeros polares como metacrilato de metila, polímeros hidrofóbicos como o Accurel e suportes inorgânicos, como sílica de porosidade controlada (DE CASTRO et al, 2008; SOARES et al., 1999).

Vários trabalhos são encontrados na literatura que tratam das diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meio aquoso ou não-aquoso (SCHMID et al., 2002; PEREZ et al., 2007; SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007). Entretanto, as mais recentes tecnologias de imobilização de enzimas requerem materiais com combinação de propriedades que não são encontradas nos materiais convencionais. Materiais híbridos orgânico-inorgânico

constituem uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais, com uma larga faixa de aplicações.

Recentemente, nanopartículas magnéticas tem sido reconhecida como um dos suportes mais atrativos para imobilização de enzimas. O uso de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas é possível devido à funcionalização de sua superfície. A aplicação de nanopartículas magnéticas para imobilização de enzimas é de grande interesse, pois está baseada na fase heterogênea sólido-líquido do meio reacional (REBELO, 2009).

3.3.1. Suportes híbridos

Materiais híbridos são constituídos pela combinação dos componentes orgânicos e inorgânicos que, normalmente, apresentam propriedades complementares, dando origem a um único material com propriedades diferenciadas daquelas que lhe deram origem. Esses materiais são homogêneos, devido à mistura dos componentes em nível molecular, usualmente em escala de nanômetro a sub-micrômetro (JOSÉ; PRADO, 2005). Embora tais materiais sejam macroscopicamente homogêneos, suas propriedades refletem a natureza química dos blocos pelos quais foram formados. As propriedades de um material híbrido não são apenas a soma das contribuições individuais de seus constituintes; existe um sinergismo que depende também da natureza química dos segmentos orgânicos e inorgânicos e do tamanho e morfologia dos correspondentes domínios (JOSÉ; PRADO, 2005).

Híbridos orgânico-inorgânicos são materiais de grande interesse em aplicações em vários campos, tais como, revestimentos protetores, eletrólitos, catálise, biocatálise, esferas monodispersas, materiais biomédicos e vidros híbridos, devido às suas propriedades mecânicas, ópticas e térmicas, que combinam a estabilidade térmica e química dos materiais cerâmicos, com a processabilidade e a flexibilidade dos compostos e polímeros orgânicos (JOSÉ; PRADO, 2005).

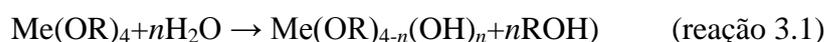
Independentemente da estratégia utilizada para preparar uma matriz híbrida, o processo sol-gel é, indiscutivelmente, o mais empregado. O processo sol-gel envolve diversas variáveis, como tempo e temperatura da reação, natureza do catalisador, concentração de reagentes, entre outros (JOSÉ; PRADO, 2005).

O processo sol-gel pode ser facilmente reconhecido, pois trata de qualquer rota de síntese de materiais no qual em um determinado momento ocorre a transição de um

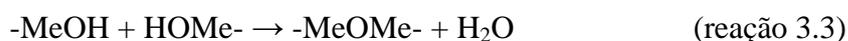
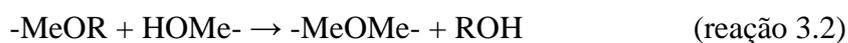
sistema de um líquido “sol” (essencialmente coloidal) para sistema gel (sólido) (REETZ, 2006; JOSÉ; PRADO, 2005).

A química do processo sol-gel é baseada em reações de “polimerização” inorgânica. De acordo com Ingersoll; Bright (1997) o processo é simples e envolve uma reação em três etapas.

Na primeira etapa (reação 3.1), a hidrólise de um precursor alcóxido de um metal ou de um semi-metal leva a formação de um produto hidroxilado e o álcool correspondente:



Em seguida, ocorre uma condensação entre um grupamento não hidrolisado do alcóxido e uma hidroxila (reação 3.2) ou entre duas hidroxilas (reação 3.3) com formação de uma mistura coloidal chamada de “sol”:



Na última etapa, ocorre a policondensação entre os colóides seguidos de reticulação, formando uma rede tridimensional porosa e vítrea.

Os precursores mais comumente utilizados são os alcóxidos metálicos, entre os quais, o mais estudado é o tetraetilortossilicato (TEOS). A possibilidade de incorporação de um material orgânico em uma fase inorgânica é extremamente atraente para a preparação de suportes para a imobilização de enzimas de interesse industrial como lipase (PAULA et al., 2008; SANTOS et al., 2008).

A escolha adequada das condições de processamento do método sol-gel resulta no controle estrutural do material híbrido obtido. A fonte do precursor orgânico não é o único fator que age no material final, desta forma é necessário considerar alguns parâmetros cinéticos, como: catalisador e modo de secagem o material final não apenas é resultado do precursor orgânico, mas também resultado das adequadas condições de reação (NASSAR et al., 2002).

A hidrólise e condensação de alcóxidos de silício é um método relativamente barato e conveniente para a produção de silicatos, que podem ser finamente dispersos em diferentes matrizes poliméricas.

As reações de hidrólise e condensação de alcoxissilanos requerem o uso de catalisadores. Diferentes estruturas são obtidas quando se utiliza catalisadores ácidos ou básicos. Estes diferentes arranjos dos silicatos se refletem na distribuição dos domínios de sílica nos híbridos. Encontra-se bem estabelecido que os catalisadores ácidos produzem estruturas mais lineares e fáceis de dispersar que os catalisadores alcalinos. Neste caso, estruturas mais ramificadas e condensadas são geradas, as quais não se dispersam bem em matrizes poliméricas.

A sílica é um polímero inorgânico, consistindo de grupos siloxanos (Si-O-Si) em seu interior, e de grupos silanóis (Si-OH) em sua superfície. A sílica forma uma das classes de substâncias inorgânicas mais utilizadas como suporte de uma variedade de sistemas com diferentes ramos de aplicação. A principal propriedade estudada na sílica está relacionada à sua superfície, a qual possui um considerável interesse quanto aos estudos das suas propriedades de adsorção de moléculas ou íons (NASSAR et al., 2002).

Na preparação dos compósitos poliméricos híbridos existem duas estratégias principais para estabelecer interações químicas e físicas entre os componentes deste material. Uma das estratégias é o tratamento orgânico da superfície das partículas inorgânicas e a outra consiste na inserção prévia de um monômero hidrofílico na cadeia polimérica. Quando a carga é o SiO₂ a estratégia mais simples consiste em reações de substituição na superfície da sílica (CAMILO, 2006).

Em matrizes polares, como o álcool polivinílico, a presença de segmentos lineares ricos em grupos Si-OH favorece a formação de pontes de hidrogênio entre os grupos carbonila destes polímeros, favorecendo a compatibilização entre as fases orgânica e inorgânica. A matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (SiO₂-PVA) para imobilização de diferentes fontes de lipase tem sido testada com relativo sucesso como atestam os trabalhos publicados na literatura (DE CASTRO et al., 2008; FREITAS et al, 2009). Essa matriz também tem apresentado bom desempenho quando magnetizada, conforme metodologia descrita por BRUNO et al, 2004 e BRUNO et al, 2005.

3.3.2. Suportes magnéticos

As partículas magnéticas funcionalizadas ou quimicamente modificadas são constituídas basicamente de um núcleo magnético, envolvido por uma camada polimérica com sítios ativos ou não, que podem ancorar metais ou compostos orgânicos seletivos. As propriedades magnéticas de um material são devidas inteiramente aos elétrons dos átomos, que têm um momento magnético, em virtude de seus movimentos (em torno de seu próprio eixo e do núcleo do átomo) (CULLITY, 2009). Estas partículas podem ser consideradas como materiais híbridos, orgânico-inorgânicos. Os materiais híbridos, orgânico inorgânico, tendem a ser uma alternativa para a produção de novos materiais multifuncionais específicos, com uma ampla faixa de aplicações (CAMILO, 2006; YMAMURA et al., 2002, YMAMURA et al., 2004).

A descoberta de partículas magnéticas estendeu os limites da tecnologia e tem despertado grande interesse nos últimos anos, devido à suas propriedades químicas e físicas únicas, por meio de modificações de superfície as partículas magnéticas quando incorporados no composto polimérico despertam interesse para diversas finalidades, incluindo aplicações tecnológicas, industriais, ambientais, biológicas e médicas (TRAN et al., 2012; POLSHETTIWART et al., 2011; DIEGUES et al., 2012).

Para o universo da catálise e biocatálise as partículas fornecem materiais com maior seletividade, excelente atividade e elevada estabilidade. Estas características podem ser facilmente alcançadas mediante a adaptação do tamanho, morfologia, composição, estrutura eletrônica e térmica e estabilidade química do material particular (TRAN et al., 2012; POLSHETTIWART et al., 2011; CULLITY et al., 2009).

Sabe-se que as partículas por terem áreas superficiais elevadas, quando são dispersas em matrizes poliméricas promovem alterações nas propriedades da matriz, que são relacionadas com a interação química específica entre as cargas e o polímero. Este tipo de interação pode influenciar na dinâmica molecular da matriz polimérica resultando em alterações significativas nas suas propriedades físicas, nomeadamente no seu comportamento térmico e/ou mecânico (REBELO, 2010).

Desta forma o mecanismo de atuação das partículas magnéticas está ligado diretamente à grande área superficial, uma aglomeração das mesmas inibe este mecanismo. As aglomerações acontecem devido à presença das forças de van der Waals e da energia de superfície. Estas forças existentes no aglomerado podem ser rompidas por meio de

processos físicos como o cisalhamento, que possibilita o rompimento desses, ou químicos, que envolvem adição de surfatantes ou funcionalização da superfície (TARTAJ et al., 2005; MAITY et al., 2007).

Além da tendência a aglomerar, outra limitação comum às partículas magnéticas, é sua instabilidade com respeito à oxidação quando exposta ao ar. Para superar estes problemas, utiliza-se a síntese em condições inertes, como por exemplo, em atmosfera de argônio e nitrogênio (CAMILO, 2006).

Como parâmetros críticos para as partículas magnéticas destacam-se: o tamanho das partículas, que deve ser o menor possível para produzir boa difusão e proporcionar maior área de superfície ativa, a característica da superfície que é importante para facilitar o encapsulamento das partículas magnéticas, o que as protege de degradação e a boa resposta magnética para a adequada aplicação. Outras características importantes das partículas de óxido de ferro magnéticas são as baixas toxicidades para os seres humanos, biocompatibilidade e injetabilidade (YMAMURA et al., 2002).

Recentemente as atenções têm sido voltadas para métodos simples e reprodutíveis de síntese de partículas magnéticas com tamanho e forma desejáveis sem aglomeração de partículas. A maior dificuldade em sintetizar partículas ultrafinas é o controle do tamanho da partícula. Essa dificuldade ocorre devido à alta energia de superfície deste sistema (TARTAJ et al., 2005).

Por apresentarem alta área superficial e, portanto, alta energia superficial, há possibilidade do uso das partículas magnéticas para a imobilização de enzimas. Além disso, há algumas vantagens em seu uso para este processo como: facilidade de recuperação do derivado imobilizado do meio reacional, utilizando apenas um magneto, simplicidade no processo de obtenção, dependendo do método utilizado para a síntese, possibilidade de funcionalização da superfície, resistência a altas temperaturas que pode fornecer maior estabilidade térmica à enzima. Uma das partículas magnéticas mais utilizadas para a imobilização de enzimas é a magnetita (Fe_3O_4) (LIU et al., 2005).

A produção de materiais híbridos, orgânico-inorgânicos, que agregam partículas magnéticas a polímeros podem ser tratados quimicamente para se comportarem de maneira hidrofóbica (CAMILO, 2006). Desta forma a deposição de camada de sílica em partículas magnéticas faz com esses compostos sejam classificados como materiais orgânico-inorgânicos, que permitem eficiência no processo de imobilização (TRAN et al., 2012). Além disso, a camada de sílica age como um escudo protetor que pode evitar que o núcleo

magnético seja corroído por reação com o ambiente, a referida camada atua como um óxido inorgânico com grande versatilidade em modificação da superfície e tem caráter hidrofílico com biocompatibilidade em aplicação biológica (TRAN et al., 2012).

Existem diversas rotas para a síntese de partículas magnéticas, tais como: microemulsão, processo sol-gel, co-precipitação, evaporação gasosa e cada tipo de síntese determina a forma e a uniformidade dos tamanhos (DIEGUES et al., 2012).

As importantes propriedades físicas das partículas magnéticas têm permitido sua aplicação em vários campos como a biomedicina (GUPTA; GUPTA, 2005; TARTAJ et al., 2005; ATANASIJEVIC et al., 2006), desenvolvimento de biosensores (VIJAYALAKSHMI et al., 2008), purificação de água (SAVAGE; DIALLO, 2005) e remediação ambiental (ZHANG, 2003).

3.4. Magnetismo

O termo Magnetismo está associado ao fenômeno de atração e repulsão. A primeira utilização do Magnetismo foi na antiguidade com a invenção da bússola. A primeira indicação de que o fenômeno magnético era conhecido no mundo antigo é o fato de que o mineral magnético, magnetita, rocha magnética em seu estado natural, era referido na Mesopotâmia como “hematita que agarra”. Os primeiros registros conhecidos das propriedades do ímã foram feitos na Grécia. O filósofo grego Thales de Mileto, que viveu no século VI AC, considerava o ímã como possuidor de uma “alma” (GUIMARÃES, 2005).

Com a descoberta da eletricidade no século XIX os fenômenos magnéticos ganharam uma dimensão maior uma vez que possuíam correlação com a descoberta. Em 1820 Oersted descobriu que uma corrente elétrica passando por um fio produzia efeito magnético. Mais tarde Ampère formulou a lei que relaciona a densidade total de correntes com o campo magnético criado com a intensidade da corrente no fio (GUIMARÃES, 2005).

Faraday na Inglaterra e Henry nos Estados Unidos descobriram que um campo variável podia induzir corrente elétrica em um circuito (GUIMARÃES, 2005).

Todas as substâncias sejam elas: sólidas, líquidas ou gasosas, mostram alguma característica magnética, em todas as temperaturas. Dessa forma, o magnetismo é uma propriedade básica de qualquer material e está presente em todas as escalas de tamanho e em muitos fenômenos naturais (CULITY, 2009; GUIMARÃES, 2005).

O magnetismo da matéria surge essencialmente dos elétrons, que contribuem com dois termos: o movimento orbital do elétron ao redor do núcleo e movimento “spin” do elétron, ao redor do seu próprio eixo (CAMILO, 2006).

Os sistemas relevantes para o magnetismo são aqueles nos quais existem átomos com camadas eletrônicas incompletas e elétrons de condução.

A ordem magnética surge da interação de troca (ou intercâmbio), interação de origem eletrostática. Um campo magnético existe quando um objeto com carga elétrica e velocidade sofre a ação de uma força (Força de Lorentz) (GUIMARÃES, 2005).

Na tecnologia moderna os materiais magnéticos apresentam um grande número de aplicações em produtos e processos industriais dos mais variados setores, as aplicações vão desde pequenos ímãs a componentes eletrônicos sofisticados (CAMILO, 2006; YMAMURA et al., 2002, YMAMURA et al., 2004).

3.4.1. Classificação dos materiais quanto ao magnetismo

O magnetismo pode ser classificado apenas quando há presença de um campo magnético externo. De uma forma mais geral, existem dois tipos de magnetismo nos materiais: o magnetismo induzido e o magnetismo espontâneo. O magnetismo induzido só existe na presença de um campo magnético aplicado. O magnetismo espontâneo, como indicado pelo próprio nome, não necessita da aplicação de um campo para existir (GUIMARÃES, 2005).

De acordo com a facilidade com que são magnetizados e desmagnetizados, os materiais que apresentam magnetismo espontâneo podem ser divididos em macios (também conhecidos como moles ou doces) e duros. Os considerados macios são facilmente magnetizados e desmagnetizados, como o ferro-silício e óxidos magnéticos macios (ferritas). Os considerados duros, por outro lado, só serão magnetizados quando submetidos a um campo magnético bastante elevado. Uma vez magnetizados, são de difícil desmagnetização. Como exemplo destes materiais tem-se o alnico (liga de alumínio, níquel e cobre) e a ferrita de bário que são utilizados como ímãs permanentes (CULLITY, 2009).

Os materiais magnéticos são classificados conforme seu comportamento magnético em 5 categorias: diamagnéticos, paramagnéticos, antiferromagnéticos, ferromagnéticos e ferrimagnéticos. O prefixo refere-se à natureza das interações de ligação entre os dipolos dentro do material (CULLITY, 2009; GUIMARÃES, 2005).

Diamagnéticos: é o tipo mais fraco de resposta magnética de um sistema, não possuem dipolos magnéticos permanentes, ou seja, os átomos têm camadas eletrônicas completas, são repelidos por uma região de campo mais intenso. O elétron, ao executar o seu movimento orbital em torno do núcleo, produz um campo magnético. Dentre as substâncias diamagnéticas, podem ser citados: água, gases nobres, não metais como S e P, moléculas diatômicas como H₂ e maioria dos compostos orgânicos.

Paramagnéticos: atraídos por uma região de campo mais intenso, são aqueles formados por átomos, íons ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados. Consequentemente, o átomo produz um campo total, não nulo, comportando-se como um minúsculo magneto elementar. Exemplos de substâncias paramagnéticas incluem: cálcio, cromo, magnésio, alumínio, platina, gases diatômicos com o oxigênio e íons de metais de transição.

Ferromagnéticos: são fortemente atraídos por uma região de campo magnético há um alinhamento espontâneo mais intenso dos magnetos elementares, pois os átomos possuem momentos de dipolo permanentes que interagem entre si causando alinhamento paralelo. Entre as substâncias ferromagnéticas, podem ser citados: ferro, cobalto e níquel.

Antiferromagnéticos: os átomos possuem momentos de dipolo permanentes, isto é, os momentos de dipolo adjacentes interagem entre si causando alinhamento antiparalelo na presença de um campo magnético externo e alinham-se na direção e no sentido do campo aplicado, exemplos: compostos de metais de transição MnO, FeO e NiO.

Ferrimagnéticos: os átomos possuem momentos de dipolo permanentes que interagem entre si, causando alinhamento antiparalelo e desigual, e na presença de um campo magnético externo alinham-se na direção e sentido do campo aplicado. Como exemplo, podem ser citadas as ferritas M²⁺O. Fe₂O₃, na qual M pode ser Fe, Ni, Co, Cu, Mn ou Mg.

Os materiais diamagnéticos, paramagnéticos e antiferromagnéticos não possuem magnetização espontânea, ao contrário dos ferromagnéticos e ferrimagnéticos. Um material ferromagnético é facilmente magnetizado. Quando submetido a um forte campo magnético, a magnetização aproxima-se de um limite chamado saturação. O ponto de saturação é o ponto no qual um aumento da força de magnetização não exerce mais nenhuma influência sobre o material. Quando um campo magnético é aplicado e então removido, a magnetização não retorna ao valor original e este fenômeno é denominado histerese (CULLITY, 2009).

Para classificação dos materiais magnéticos, é construída a curva de histerese para indicar a magnetização e a desmagnetização do material, conforme ilustrado na Figura 3.3 (MEDEIROS, 2010). Nesta figura, primeiramente aumenta-se a intensidade do campo magnético até um ponto de saturação da amostra (de a até d), em que o campo não exerce mais influência na amostra. Em seguida, ocorre a inversão do campo magnético até o ponto de saturação (d), iniciando um novo ciclo (MEDEIROS, 2010).

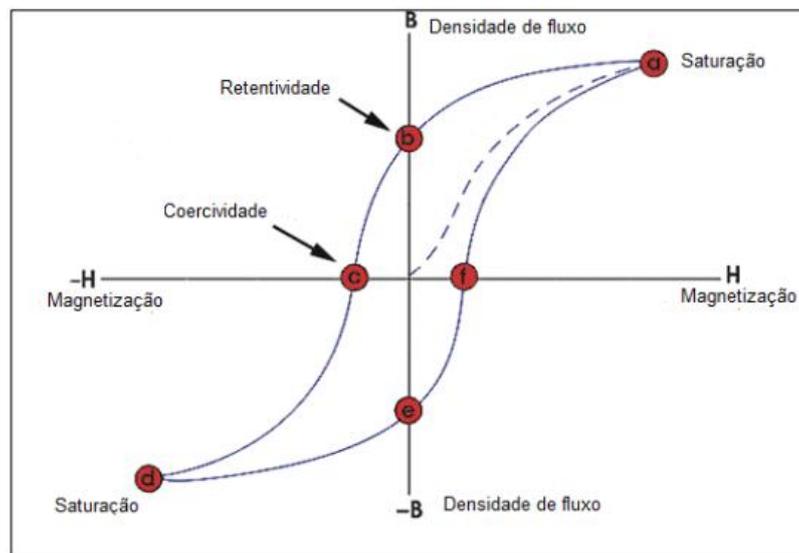


Figura 3.3. Curva de histerese e seus parâmetros.
Fonte: (NDT, Education Center, 2013)

Assim, a obtenção de uma curva larga indica que esse material é de difícil magnetização, ou seja, é um material com baixa permeabilidade e alta retentividade, ao contrário de uma curva estreita, que indica um material com alta permeabilidade, baixa retentividade e baixa relutância (MEDEIROS, 2010). Esta curva mostra a relação entre a

densidade de fluxo magnético induzido com a força de magnetização. Por isso é também conhecida como curva (fluxo magnético versus força de magnetização).

Os óxidos de ferro apresentam um único domínio magnético (um único direcionamento quando recebem a influência de um campo magnético externo) e são denominados superparamagnéticos, apresentando baixa retentividade e relutância, possuindo, assim, a característica de não formarem agregados e de dispersarem rapidamente na solução após a remoção do campo magnético (MEDEIROS, 2010; CAMILO, 2006).

Quando um material ferromagnético é submetido a um ciclo de varredura de campo magnetizante H , ocorre um rearranjo da distribuição dos momentos magnéticos para manter reduzida a energia do sistema. Existem dois mecanismos relevantes que atuam para compensar o efeito do campo magnético externo: o movimento das paredes que separam os domínios e a rotação dos momentos. O primeiro atua aumentando as regiões com as direções de magnetização mais alinhadas com o campo aplicado. Este processo acaba suprimindo as demais paredes de domínios. Quando este mecanismo não é mais possível, ocorre então, a rotação dos momentos magnéticos que tendem ao alinhamento com o campo magnético externo. Estes processos são dissipativos, resultando na curva de histerese magnética B versus H . A área interna do ciclo de histerese representa a energia dissipada para realizar um ciclo de histerese. Este é um, entre os vários métodos possíveis, para determinar o valor das perdas magnéticas (CULITY, 2009; CAMILO, 2006; GUIMARÃES, 2005).

O processo de magnetização do material pode ocorrer de duas formas, por deslocamento das paredes de domínios magnéticos e/ou por rotação da magnetização local dentro dos domínios. A movimentação e nucleação das paredes de domínio minimizam a energia magnetostática. Quando as dimensões do material magnético diminuem a um tamanho crítico D_c , a quantidade de energia para produzir paredes de domínios torna-se maior do que a redução da energia magnetostática tornando-o desfavorável para suportar domínios múltiplos. Como consequência, apenas um monodomínio é formado e suportado, ocorrendo então à magnetização espontânea (CAMILO, 2006).

3.4.2. Superparamagnetismo de partículas magnéticas

Anisotropia magnética é, basicamente, a tendência que um material magnético apresenta de se magnetizar em certas direções. A anisotropia magnetocristalina é

decorrente do acoplamento spin-órbita, pois quando um campo externo tenta reorientar o spin de um elétron, a órbita do elétron também tende a ser reorientada, mas como a órbita está fortemente acoplada à rede cristalina, a reorientação do spin requer certa energia.

A forma pela qual um sólido composto por um grande número de momentos magnéticos reduz a energia magnética no espaço em torno do material é formar domínios magnéticos nas direções de fácil magnetização, de modo que a soma dos momentos dos domínios seja essencialmente zero. Embora dois domínios vizinhos tenham orientações diferentes, os momentos magnéticos em cada domínio são paralelos por causa da interação de troca (CARDOSO, 2011).

A competição entre a energia de troca e a energia de anisotropia magneto cristalina determina a espessura das regiões de transição entre os domínios. Quando o tamanho das partículas é menor ou da mesma configuração energeticamente mais favorável fornece um arranjo no qual todos os momentos magnéticos da amostra estão paralelos, conhecido como monodomínio. Quando uma partícula monodomínio está magnetizada uniformemente, com todos os spins paralelos há um estado magnético denominado superamagnetismo (CARDOSO, 2011).

O domínio magnético representa um agrupamento de átomos no qual todos os momentos magnéticos atômicos estão alinhados. Nos materiais, geralmente os vetores de magnetização dos domínios estão arranjados de tal forma que a soma vetorial acabe ficando próxima à zero, levando a uma redução da energia magnetoestática e à aproximação da condição de equilíbrio, correspondente ao mínimo de energia potencial armazenada (REBELO, 2009).

As partículas magnéticas são ditas superparamagnéticas significando que são atraídas por um campo magnético, mas não retêm nenhum magnetismo após a remoção do campo (Figura 3.4). Este termo é utilizado exclusivamente para partículas magnéticas, com um único domínio magnético, ou seja, partículas magnetizadas uniformemente com todos os spins alinhados na mesma direção, como os óxidos de ferro, ferrita e a maghnetita que apresentam um comportamento magnético peculiar denominado superparamagnetismo (DIEGUES et al., 2012; NERI, 2008; YAMAMURA et al, 2004). O uso partículas magnéticas com comportamento superparamagnéticos, representa uma abordagem do conceito de química verde, pois permitem sucessivos ciclos de recuperação (POLSHETTIWART et al., 2011).

Partículas magnéticas que apresentam comportamento superparamagnético têm sido amplamente estudadas para diversas aplicações. Por serem magnéticas, as partículas magnéticas podem ser facilmente concentradas em um local específico quando aplicado um campo magnético externo. Quando este campo é removido elas são redispersas. Além disso, as partículas magnéticas apresentam uma grande superfície que pode ser modificada para serem anexadas a agentes biológicos (TARTAJ et al., 2005).



Figura 3.4. Aplicação de campo magnético em partículas superparamagnéticas.

Fonte: GUIMARÃES, 2005 (adaptado).

3.4.3. Partículas de Fe_3O_4

O ferro é o material mais utilizado na síntese de partículas magnéticas e uma das partículas magnéticas mais utilizadas para aplicações biotecnológicas é a magnetita (Fe_3O_4). A magnetita particulada sem revestimento é facilmente oxidada ao ar, levando a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), mas sem perda de magnetização (REBELO, 2009). Devido à oxidação durante a síntese, a composição final das partículas magnéticas pode ficar entre magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (YAMAMURA et al, 2004; CAMILO 2006; REBELO, 2009).

A alta reatividade ocorre obviamente devido a alta razão volume/superfície. Devido à elevada mobilidade dos elétrons as partículas de magnetita apresentam uma química de superfície interessante. Diferentes trocas interfaciais iônicas e/ou eletrônicas podem estar envolvidas na transformação dependendo do pH da suspensão. Em meio básico a oxidação da magnetita ocorre através de uma redução do oxigênio na superfície da partícula (somente transferência eletrônica) e coordenação dos íons óxidos, enquanto em meio ácido e condições anaeróbias, íons Fe^{2+} da superfície são desorvidos como complexos em solução (transferência iônica e eletrônica) (DIEGUES et al., 2012; HANNICKEL; 2011). Em ambos os casos, a oxidação do íon Fe^{2+} está correlacionada com a migração de cátions através da estrutura criando lacunas a fim de manter o equilíbrio de cargas (JOLIVET; TRONC; CHANÉAC, 2006).

As magnetitas são óxidos, em geral magnéticos, com estrutura conhecida como espinélio esta é caracterizada pelo empacotamento de íons de oxigênio em um arranjo cúbico de face centrada, e os íons metálicos ocupando os sítios entre os íons de oxigênio. No sítio tetraédrico (sítio A), o íon metálico (cátion) está localizado no centro de um tetraedro cujos vértices são preenchidos por íons de oxigênio (ânions). No segundo sítio, denominado de octaédrico (sítio B), o íon metálico se localiza no centro de um octaedro cujos vértices são preenchidos por átomos de oxigênio (CULLITY, 2009).

A célula unitária do espinélio contém tantos íons que um desenho da célula completa seria complexo. Em vez disso, costuma-se dividir a célula unitária em oito partes. Os quatro cubos sombreados possuem estruturas iguais entre si e o mesmo acontece com os cubos não sombreados (CARDOSO, 2011). A estrutura dos dois cubos inferiores é ilustrada na Figura 3.5.

Observando a Figura 3.5, verifica-se um cátion em simetria tetraédrica no centro do cubo da direita. Outros cátions em simetria tetraédrica também estão presentes, mas ligados a ânions de cubos vizinhos. Quatro cátions em simetria octaédrica estão presentes no cubo da esquerda: um está ligado por linhas tracejadas a seis ânions e os outros três estão ligados a ânions de cubos vizinhos. Os ânions estão arranjados de forma tetraédrica em todos os cubos.

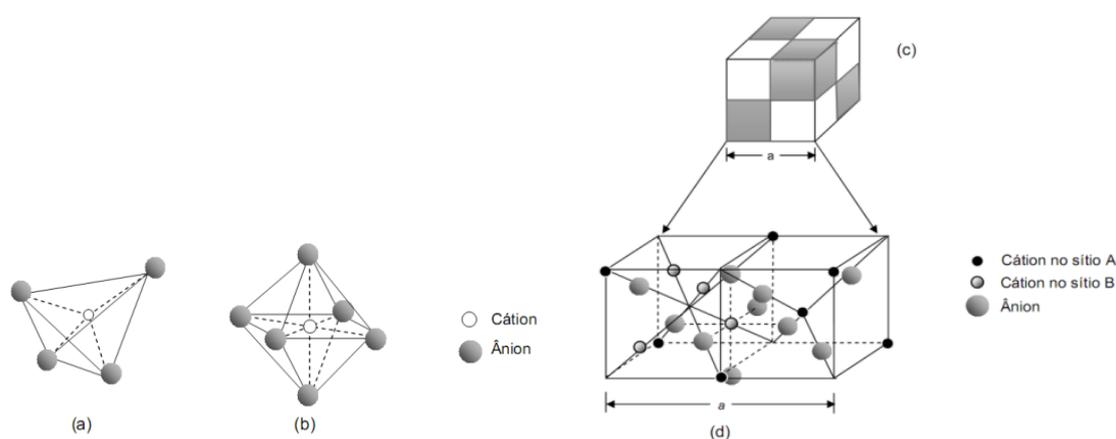


Figura 3.5. Estrutura cristalina da magnetita: a) sítio tetraédrico, b) sítio octaédrico, c) célula unitária, d) estrutura de dois cubos inferiores indicados em c.

Fonte: CAMILO, 2006; CARDOSO, 2011 (adaptado).

A preferência pela ocupação de sítios tetraédricos ou octaédricos pelos íons metálicos divalentes depende da preferência orbital para coordenações específicas, do raio iônico, do tamanho dos interstícios e, algumas vezes, do método de preparação. Em algumas ferritas, o grau de inversão é variável e depende do tratamento térmico sofrido pela amostra (CARDOSO, 2011).

A magnetita e a maghemita apresentam estrutura semelhante com parâmetros de rede $a = 0,839$ nm e $0,834$ nm, respectivamente (DUARTE, 2005).

Neste contexto, existe uma grande dificuldade para se distinguir a magnetita da maghemita usando a técnica de difração de raios X, visto que ambas apresentam reflexões de raios-X nas mesmas posições. O que as diferencia é o fato da magnetita consistir de íons Fe^{2+} ocupando 8 sítios tetraédricos (A) e íons Fe^{3+} ocupando 16 sítios octaédricos (B) numa célula unitária, enquanto na maghemita, ambos os sítios A e B são ocupados por átomos trivalentes Fe^{3+} (DUARTE, 2005; CAMILO, 2006).

3.5. Métodos de obtenção das partículas magnéticas

Neste tópico será feita uma breve discussão de algumas rotas sintéticas importantes mais frequentemente usadas para a obtenção de partículas magnéticas. Na literatura, são relatados diversos métodos para a síntese de materiais magnéticos, tanto físicos quanto químicos. Dos métodos físicos, destacam-se o método de moagem e deposição por vapor. Dentre os procedimentos químicos, os mais utilizados são os métodos de precipitação por hidrólise alcalina, microemulsão e decomposição térmica (HOLLAND; YAMAMURA, 2013).

Cada tipo de síntese determina o tamanho, a forma e a uniformidade dos tamanhos, fatores que podem interferir nas propriedades magnéticas como magnetização de saturação e coercividade (HOLLAND; YAMAMURA, 2013). Existe uma faixa de tempo reacional e de temperatura para cada método químico utilizado isto se deve pelo fato de diferentes metais que podem ser utilizados para a obtenção das partículas magnéticas.

3.5.1. Decomposição térmica

O método de análise térmica consiste na rápida injeção de reagentes, frequentemente compostos organometálicos dentro de uma solução de surfatantes a quente. Este método rende um melhor controle da distribuição do tamanho e da forma das

partículas magnéticas, distribuição de tamanho estreita e boa cristalização além de partículas bem dispersas (REBELO, 2009).

A estratégia básica deste tipo de processo é sintetizar partículas usando precursores metálicos coordenados em um processo não hidrofílico e então usar as partículas magnéticas resultantes como sementes para posteriores nucleações (CAMILO, 2006).

Com o desenvolvimento corrente e progresso futuro será possível bioaplicações utilizando partículas magnéticas com tamanho e forma definidos.

3.5.2. Microemulsão

A microemulsão pode ser definida como uma dispersão isotrópica estável de dois líquidos imiscíveis, consistindo de domínios nanométricos de um ou ambos líquidos, estabilizados por um filme interfacial de moléculas ativas na superfície (PILLAI et al., 1995). Microemulsões podem ser classificadas como água em óleo ou óleo em água dependendo da fase contínua e dispersa.

As microcavidades do surfatante-estabilizado providenciam um efeito de confinamento que limita a nucleação da partícula, crescimento e aglomeração. Particularmente, microemulsões tem sido altamente usada para a produção de partículas.

Estudos recentes referentes ao uso de microemulsões para a preparação de partículas magnéticas para aplicação em biotecnologia têm sido focados na preparação através do recobrimento por sílica. Por exemplo, nanocompositos estabilizados por sílica melhoraram a imobilização da beta-lactamase via ligação química (REBELO, 2009).

Usando a técnica de microemulsão, partículas podem ser preparadas como esferas, mas também como o formato de tubos. A síntese em microemulsão é limitada e o rendimento é baixo quando comparada a outros métodos, como decomposição térmica e co-precipitação (REBELO, 2009).

3.5.3. Método de co-precipitação

O processo de co-precipitação é relativamente simples e consiste na mistura de sais inorgânicos metálicos em ambiente aquoso seguido de precipitação com base (HANNICKEL, 2011).

Este método apresenta inúmeras vantagens (BLASKOV et al., 1996) tais como: homogeneidade química, temperaturas de reação e sinterização baixas, partículas finas com distribuição de tamanho estreita, equipamento para produção de baixo custo, pós com boa

reatividade, uniformes com fraca ou nenhuma aglomeração, economia de tempo, fácil ampliação de escala e baixo custo (JANASI et al., 2002).

Dois métodos principais podem ser utilizados para a obtenção da magnetita Fe_3O_4 particulada. No primeiro, o suporte é magnetizado pela reação de co-precipitação de Fe^{+2} com Fe^{+3} em meio alcalino (BRUNO et al., 2005). No segundo, o composto obtido pela co-precipitação de Fe^{+2} com Fe^{+3} em NaOH é incorporado ao suporte híbrido durante sua síntese formando o sistema sol-gel contendo partículas magnetizadas (SUGIMOTO et al., 1998). A magnetização ocorre conforme reações esquematizadas em 3.4 e 3.5:



O método de coprecipitação consiste de dois processos: a nucleação (formação de centros de cristalização) e o crescimento subsequente das partículas. As taxas relativas desses dois processos determinam o tamanho e a polidispersão das partículas obtidas. Coloides polidispersos são obtidos como resultado simultâneo da formação de novos núcleos e do crescimento das partículas formadas recentemente. Se a nucleação predomina o resultado é um número grande de partículas pequenas, entretanto, se o crescimento predomina o resultado será um número pequeno de partículas maiores. Uma menor dispersão do tamanho do coloide é obtida quando a taxa de nucleação é alta e a taxa de crescimento das partículas é baixa (CAMILO, 2006).

A produção de partículas de óxido de ferro por reação de precipitação entre um sal metálico e uma base não é direta. Acredita-se que ocorra um esquema de reações complexas nas quais os cátions metálicos inicialmente precipitem na forma de hidróxidos poliméricos e, com o passar do tempo, estes hidróxidos sofrem desidratação para formar estruturas cristalinas de óxidos de ferro (AMMAR et al., 2001).

Para garantir uma boa reprodutibilidade e um bom desempenho do produto final as variáveis que devem ser controladas com critério são: pH final da solução de precipitação, tipo de ânion, ordem de adição dos reagentes, concentração dos metais, razão molar dos metais, temperaturas de precipitação e calcinação, velocidade de agitação, e outras. Estas variáveis afetam de forma significativa a natureza, a homogeneidade, o tamanho, o comportamento magnético e a energia da superfície das partículas resultantes (YAMAMURA et al., 2004; CAMILO, 2006; REBELO, 2009).

É o mais antigo método de síntese de partículas magnéticas. Apesar da extensa distribuição de tamanhos de partículas e da morfologia irregular, diversas partículas magnéticas podem ser sintetizadas usando o método clássico de precipitação aquosa. A maior vantagem desse método é a grande quantidade de material que pode ser sintetizado. Porém, é difícil estabelecer as correlações entre o crescimento e tamanhos de partículas com os fatores cinéticos (REBELO, 2009).

A cinética de formação investigada como uma função da temperatura sugere uma dependência da temperatura com o tempo na taxa de formação das partículas magnéticas. O período de indução para a formação de partículas magnéticas diminui com o aumento da temperatura (HANNICKEL, 2011).

O processo de co-precipitação homogênea resulta na formação de sólidos, cristalinos ou amorfos, nos quais as propriedades químicas e magnéticas dependem das condições do processo no qual foram formados. Para garantir uma boa reprodutibilidade e um bom desempenho do produto final, o controle cuidadoso de algumas variáveis é muito importante (HANNICKEL, 2011).

3.6. Biodiesel

Biodiesel é definido pelo Programa Nacional do uso e Produção do Biodiesel (PNPB) como um “biocombustível renovável derivado de fontes renováveis para uso em motores de combustão interna substituindo os combustíveis fósseis” (POUSA; SANTOS; SUAREZ, 2007). Suas propriedades são semelhantes ao diesel, podendo ser usado puro ou na forma de blendas ao diesel de petróleo. Além disso, apresenta algumas vantagens perante aos combustíveis fósseis, por se tratar de um combustível renovável, biodegradável, atóxico e virtualmente livre de enxofre e compostos aromáticos (SINGH; SINGH, 2010).

Uma das vantagens do biodiesel é sua adaptabilidade aos motores do ciclo diesel, pois ao contrário de outros combustíveis limpos, como o gás natural e o biogás, a combustão de biodiesel não requer adaptação dos motores, configurando-se em uma alternativa técnica capaz de atender a frota movida a diesel (RAMOS et al., 2003).

Apesar das vantagens apontadas, o biodiesel possui menor poder calorífico, emite maior quantidade de óxidos de nitrogênio (NO_x) e possui maior densidade que o petrodiesel em regiões de clima frio (MURUGESAN et al., 2009). Além disso, o preço de mercado é relativamente superior ao diesel comercial. Entretanto, se o processo de

recuperação e aproveitamento dos subprodutos (glicerina e catalisador) for otimizado, a produção de biodiesel pode ser obtida a um custo competitivo com o preço comercial do óleo diesel, ou seja, aquele verificado nas bombas dos postos de abastecimento (SUAREZ et al., 2009).

O Brasil, devido ao seu pioneirismo no setor de biocombustíveis, tem firmado parcerias de transferência de tecnologia e cooperação na produção e comercialização de biocombustíveis com vários países (MASIEIRO; LOPES, 2008). Atualmente o Brasil é o segundo produtor mundial de biodiesel, contando com 70 plantas produtoras autorizadas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP) para operação no país, correspondendo a uma capacidade total autorizada de 23.046,06 m³dia⁻¹. Destas 70 plantas, 66 possuem autorização para comercialização do biodiesel produzido, correspondendo a 21.542,04 m³dia⁻¹ de capacidade autorizada para comercialização (ANP, 2013).

Há ainda duas novas plantas de biodiesel autorizadas para construção e 11 plantas de biodiesel autorizadas para ampliação. Dentre as 11 plantas autorizadas para ampliação, 5 são para aumento da capacidade de produção de biodiesel e 6 são para ampliações que não alteram a capacidade final de produção de biodiesel, possuindo como objeto aumento da tancagem, construção de caldeiras ou instalação de novos equipamentos. Com a finalização das obras e posterior autorização para operação, a capacidade total de produção de biodiesel autorizada poderá ser aumentada em 1.564,72 m³dia⁻¹, que representa um acréscimo de 6,8% na capacidade atual (ANP, 2013).

A introdução do biodiesel na matriz energética brasileira é reconhecida internacionalmente como um caso de sucesso em matéria de uso de combustível renovável em larga escala. Desde 1º de janeiro de 2010, o óleo diesel comercializado em todo o Brasil contém 5% de biodiesel. Esta regra foi estabelecida pela Resolução nº6/ 2009 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), publicada no Diário Oficial da União (DOU) em 26 de outubro de 2009, que aumentou de 4% para 5% o percentual obrigatório de mistura de biodiesel ao óleo diesel. A contínua elevação do percentual de adição de biodiesel ao diesel demonstra o sucesso do Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel e da experiência acumulada pelo Brasil na produção e no uso em larga escala de biocombustíveis (ANP, 2013).

3.6.1. Matérias-primas para produção de biodiesel

No Brasil, 85,81% do biodiesel já é produzido em escala industrial utilizando óleo de soja como matéria-prima. Entretanto, o óleo de soja está inserido na cadeia alimentícia, o que leva a busca de matérias-primas alternativas para a produção de biodiesel, como os óleos vegetais de coco, andiroba, babaçu, macaúba, palma, pinhão-manso e gorduras residuais como sebo bovino. A potencialidade nacional quanto à produção de óleos vegetais é garantida pela diversidade de culturas que podem ser produzidas no país.

As práticas agrícolas adotadas no cultivo das espécies produtoras de biodiesel são aspectos determinantes das eficiências econômica e energética do processo de obtenção de biodiesel. Devido à diversidade climática e a grande extensão territorial, nove culturas são indicadas para a síntese de biodiesel no país. A Tabela 3.3 lista as espécies consideradas alternativas promissoras, bem como o potencial produtivo de cada uma.

Tabela 3.3. Características das principais culturas oleaginosas no Brasil.

Espécie	Origem do óleo	Teor de óleo (%)	Meses de colheita por ano	Rendimento (t de óleo/ ha)
Dendê	Amêndoa	22	12	3-6
Coco	Fruto	55-60	12	1,3-1,9
Babaçu	Amêndoa	66	12	0,1-0,3
Girassol	Grão	38-48	3	0,5-0,9
Canola	Grão	40-48	3	0,5-0,9
Amendoim	Grão	40-43	3	0,6-0,8
Soja	Grão	18	3	0,2-0,4
Algodão	Grão	15	3	0,1-0,2

FONTE: Adaptado de SILVA; FREITAS, 2008.

As espécies com maior potencial produtivo são o dendê e o coco, que ainda têm a vantagem de serem culturas perenes e com colheita contínua durante o ano. Isso diminui os dispêndios energético e financeiro para a produção dessas espécies e evita a sazonalidade do fornecimento de matéria-prima, um bônus imenso em relação aos cultivos anuais (SILVA; FREITAS, 2008).

Cerca de 80% da área plantada com coqueiro situa-se na Ásia (Índia, Filipinas, Indonésia, Sri Lanka e Tailândia) e, o restante, distribuída entre África, América Latina, Oceania e Caribe. A Indonésia é destacada como o maior produtor mundial de coco, seguido por Filipinas e Índia, entretanto, em área colhida, a Filipinas destaca-se com uma maior área cultivada (Tabela 3.4) (MARTINS; JESUS JR, 2010).

Tabela 3.4. Produção e área colhida dos principais países produtores de coco, em 2008.

País	Área colhida (ha)	Produção (1.000t)
Indonésia	2.950.000	19.500.000
Filipinas	3.379.740	15.319.500
Índia	1.940.000	10.894.000
Brasil	287.016	2.759.044
Sri Lanka	394.840	2.210.000
Tailândia	245.725	1.483.927

Fonte: MARTINS; JESUS JR, 2010.

Apesar do cultivo do coqueiro estar sendo estimulado e introduzido em várias regiões do país, as maiores plantações e produções se concentram na faixa litorânea do Nordeste e parte da região Norte do Brasil. Favorecida pelas condições de tropicalidade climática, ambas as regiões detêm próximo dos 70% da produção do coco brasileiro (Tabela 3.5) (MARTINS; JESUS JR, 2010).

Tabela 3.5. Área plantada com coqueiro e produção de coco nas regiões do Brasil

Regiões do Brasil	Área plantada (ha)	Produção (mil frutos)
Nordeste	228.911	1.337.358
Norte	30.353	281.746
Sudeste	21.564	311.143
Centro-Oeste	2.934	41.116
Sul	189	2.003

Dados referentes ao ano de 2009

Fonte: MARTINS; JESUS JR, 2010.

Existem duas variedades de coco que são cultivadas no Brasil: o coqueiro-gigante e o coqueiro-anão. O coqueiro-anão se desenvolve mais lentamente que o coqueiro-gigante, mas é mais precoce e o início da frutificação ocorre por volta dos 3 ou 4 anos de idade, enquanto que no coqueiro-gigante, apenas aos 7 anos. A produção anual, em média, é de 14 e 12 cachos, para, respectivamente, coqueiro-anão e coqueiro-gigante (SLUSZZ; MACHADO, 2006).

O fruto, em termos constitucionais, pode ser dividido conforme mostrado na Figura 3.6 (ARAÚJO, 2008; ANDRADE et al., 2004):

- Epiderme: superfície lisa e cerosa, sua cor varia dependendo da variedade e maturidade do fruto;
- Mesocarpo fibroso: também chamado de cairo, é a parte intermediária, tem aparência de “palha” e geralmente cor castanha;
- Endocarpo: também chamado de cáscara, com mais ou menos 5 mm de espessura, tem cor negra, é muito duro e apresenta três costuras longitudinais mais ou menos salientes, separando os três poros germinativos;
- Albúmen: também chamada de amêndoa ou polpa, geralmente tem cor branca brilhante com 1 ou 2 cm de espessura. Em sua extremidade imediatamente após o endocarpo, existe uma fina película castanha escura chamada de tegumento seminal (casca, também chamada de Copra);
- Líquido Opalescente: Conhecido como água de coco, ocupa cerca de 3/4 do volume da cavidade central;
- Embrião: semente germinativa, localizada no albúmen, abaixo de um dos três poros germinativos.



Figura 3.6. Corte longitudinal do coco, com suas partes.

Fonte: ANDRADE et al., 2004.

Quanto ao processo de extração, o mais comumente utilizado é a extração por prensagem, conduzida em prensas contínuas tipo parafuso, em que o eixo helicoidal gira num cesto composto por barras de aço espaçadas, por onde sai o óleo. Após o procedimento de prensagem, o óleo é filtrado e as impurezas são retiradas, sendo o mesmo comercializado na forma bruta (ARAÚJO, 2008).

Em função da possibilidade de cultivo de diferentes oleaginosas no Brasil e, sabendo, *a priori*, que a qualidade biodiesel depende das matérias-primas empregadas no processo de produção, selecionou-se para a execução do presente trabalho, o óleo de coco como matéria-prima lipídica que apresenta composição rica em ácidos graxos saturados, conforme Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Composição em ácidos graxos do óleo de coco.

Ácido graxo	Composição (% em peso)
Ácido caprílico	7,7
Ácido cáprico	6,4
Ácido láurico	48,6
Ácido mirístico	17,8
Ácido palmítico	8,9
Ácido esteárico	2,2
Ácido oleico	6,8
Ácido linoleico	1,6

Fonte: JIANG; TAN (2012) adaptado.

3.6.2. Produção de biodiesel

A produção de biodiesel mais amplamente empregada na indústria se baseia na reação de alcoólise, também denominada transesterificação, de óleos vegetais com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) na presença de catalisadores.

A transesterificação é considerada a melhor rota para a utilização dos óleos vegetais como alternativa ao diesel fóssil, pois confere ao produto (biodiesel) características como viscosidade e índice de cetano muito próximas das do diesel. Os óleos e gorduras quando submetidos ao processo de transesterificação sofrem quedas bruscas nos valores do ponto de névoa e viscosidade, podendo assim o combustível obtido ser queimado diretamente em motores diesel sem a necessidade de adaptação (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

Para a obtenção de um biocombustível de alta qualidade, algumas características técnicas são imprescindíveis tais como: a reação de transesterificação deve ser completa, refletindo a ausência total de ácidos graxos remanescentes, e o biodiesel produzido deve ser de alta pureza, não contendo traços de glicerina residual ou álcool excedente de reação (KNOTHE et al., 2005).

A reação ocorre numa sequência consecutiva e reversível de três etapas reacionais. A primeira etapa envolve a formação de diacilglicerídeos a partir dos triacilglicerídeos. Na segunda, os diacilglicerídeos são convertidos em monoacilglicerídeos e na última, esses são convertidos em glicerina. Em todas essas etapas são produzidos ésteres de ácidos graxos (Figuras 3.8 e 3.9).

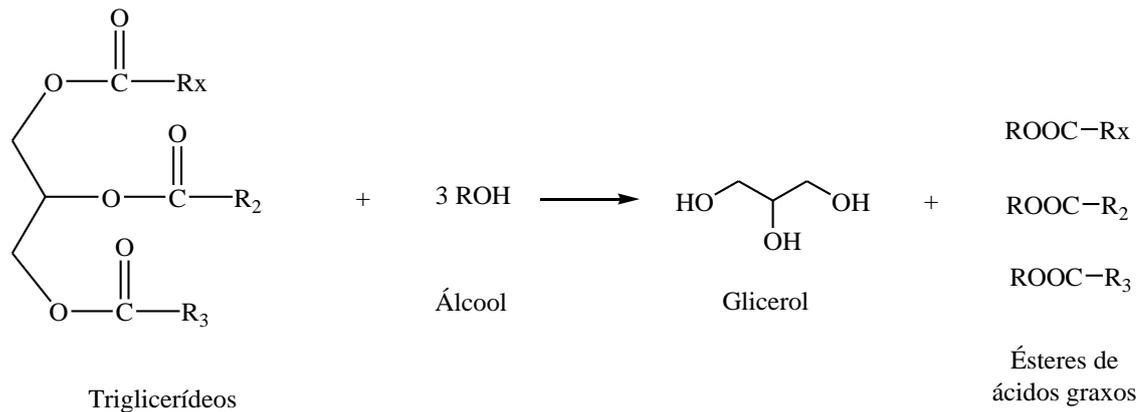


Figura 3.8. Representação esquemática da reação global de transesterificação.

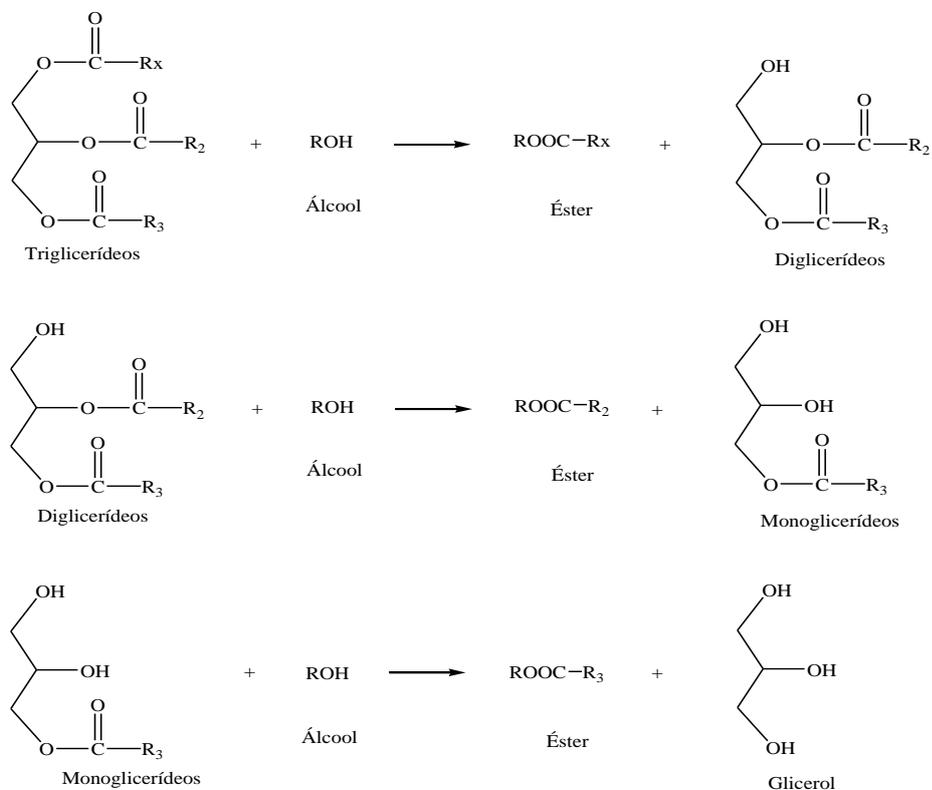


Figura 3.9. Representação esquemática das etapas envolvidas na transesterificação.

Embora a relação estequiométrica da reação seja de 1:3 (óleo e álcool), normalmente é empregado um excesso de álcool para favorecer a formação do produto final e facilitar a recuperação da glicerina (CARVALHO, 2011).

O excesso de álcool na reação não exerce efeitos sobre as características físico-químicas do biodiesel. No entanto, razões molares muito elevadas entre o álcool e o óleo podem interferir negativamente na etapa de separação da glicerina, pois o aumento da polaridade do meio reacional fornecido pelo álcool de cadeia curta incrementa a solubilidade do glicerol (MEHER; VIDYA-SAGAR; NAIK, 2006).

A utilização de metanol na transesterificação normalmente é preferida por razões econômicas (menor custo que o etanol) e também relacionada ao processo de produção (maior polaridade e isento de água). Contudo, a transesterificação utilizando etanol em vez de metanol tem sido sugerida como uma alternativa mais limpa e mais sustentável para a produção de biodiesel. (STAMENKOVIC et al., 2011). Além disso, o etanol possui dois átomos de carbono na sua cadeia carbônica e, portanto, apresenta maior massa molar que o metanol, o que significa um ganho de produtividade de massa na síntese enzimática de ésteres etílicos de ácidos graxos, resultando em uma maior quantidade de biodiesel por unidade de óleo (BRUNSCHWING et al., 2012).

Em alguns países, como o Brasil, o etanol é vendido a preços mais baixos do que o metanol, implicando que o componente álcool é mais barato do que o componente de óleo. Assim, o ganho de volume extra quando se utiliza etanol em vez de metanol poderia tornar-se um argumento de venda importante, especialmente para o mercado brasileiro (STAMENKOVIC et al., 2011; BRUNSCHWING et al., 2012).

3.6.3. Catalisadores para síntese de biodiesel

Tradicionalmente, a produção de biodiesel em escala industrial ocorre por transesterificação de óleos vegetais utilizando catalisadores homogêneos. Embora seja um processo simples, rápido e com alto rendimento, apresenta algumas desvantagens e limitações.

Desta forma, a substituição da catálise homogênea pela heterogênea surge como uma opção tecnológica interessante, pois atende a demanda por processos menos poluentes e mais seletivos e oferece inúmeras vantagens, tais como fácil separação, poucos problemas com rejeitos e possibilidade de reutilização. Além disso, o uso de catalisador heterogêneo minimiza os problemas relativos às etapas finais de purificação do biodiesel,

reduzindo a ocorrência das reações indesejáveis de saponificação e permite redução dos custos dos processos pela diminuição do número de operações associadas (BASUMATARY, 2013).

Atualmente, as pesquisas estão focadas na exploração de novos e sustentáveis catalisadores, tais como sólidos com caráter básico (óxidos, zeólitas e etc.), ácido (zircônia sulfatada e tungstada) e biológico (lipases imobilizadas).

Nesse contexto, os biocatalisadores vêm ganhando destaque na produção de biodiesel e vários estudos ressaltam o uso de lipases imobilizadas em matrizes sólidas para a reação de transesterificação. Esta rota é atrativa em função das seguintes características das lipases (SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007; FJERBAEK; CHRISTENSEM; NORDDAHL, 2008; PARAWIRA, 2009):

- ✓ são biodegradáveis e atendem aos apelos atuais da Química Verde;
- ✓ maior compatibilidade com as variações de qualidade das matérias-primas, uma vez que toleram maiores teores de ácidos graxos livres e de água presentes no meio reacional;
- ✓ capacidade de produção do biodiesel em menor número de etapas em condições reacionais brandas, levando à redução do consumo energético e da quantidade de água residual gerada no processo;
- ✓ alta especificidade, conferindo maior facilidade de separação do produto e aumento da qualidade do glicerol;
- ✓ podem ser reutilizadas quando na forma imobilizada;
- ✓ podem ser empregadas na produção de biodiesel por processo contínuo

A vantagem fundamental da síntese enzimática de biodiesel está relacionada com a possibilidade de utilização dos triglicerídeos (e glicerídeos parciais), bem como ácidos graxos livres (AGL), de forma eficiente sob condições suaves (LAM et al., 2010). Ao selecionar a enzima apropriada, é possível efetuar o processo em etapa única, mesmo com um elevado teor de AGL no óleo. Isto permite o uso de óleos de baixa qualidade e não comestível, sem causar impacto negativo no meio ambiente (LAM et al., 2010).

No caso da produção de biodiesel (Tabela 3.7) uma das vantagens da utilização de partículas magnéticas como suporte no processo de imobilização é a recuperação do biocatalisador por meio da aplicação de campo magnético (REBELO, 2009).

Tabela 3.7. Materiais magnéticos utilizados como suporte de imobilização de lipases e com a finalidade de produzir biodiesel

Percursor Magnético	Fonte de lipase	Método Imobilização	Álcool	Subtrato	Referência
Fe ₃ O ₄	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Covalente	Metanol	Óleo de soja	XIE; MA, 2010
Fe ₃ O ₄ – SiO ₂	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção	Metanol	Óleo de soja	TRAN et al., 2012
Fe ₃ O ₄	<i>Thermomyces lanuginosus</i> e <i>Candida antártica</i>	Covalente	Metanol	Óleo de soja	NGO et al., 2013
Fe ₃ O ₄	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção	Metanol	Óleo de oliva	LIU et al., 2012

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Enzima

Todos os experimentos foram realizados com a preparação comercial de lipase microbiana de *Burkholderia cepacia* manufaturada pela Amano Pharmaceuticals (Nagoya-Japão) e adquirida da Sigma-Aldrich.

4.1.2. Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: etanol anidro (99%, Cromoline) e óleo de coco adquirido da FRESCOCO (São Paulo-SP), tendo uma composição aproximada em ácidos graxos de: 8,9% Caprílico, 6,2% Cáprico, 47,1% Láurico, 18,8% Mirístico, 7,9% Palmítico, 2,6% Estearico, 6,1% Oleico e 1,6% Linoleico. Outras características da amostra do óleo de coco incluem: massa molecular (682 gmol^{-1}), índice de acidez ($0,4 \text{ mg KOH g}^{-1}$), índice de saponificação (238 mg KOHg^{-1}), índice de iodo ($25 \text{ g I}_2\text{g}^{-1}$), índice de peróxido ($0,4 \text{ mEqkg}^{-1}$) e viscosidade ($29,0 \text{ mm}^2\text{s}^{-1}$).

4.1.3. Suporte híbrido SiO₂-PVA

Como suporte foi utilizada uma matriz híbrida constituída de polissiloxano álcool polivinílico (SiO₂-PVA) preparada pela técnica sol-gel, empregando como precursor tetraetilortossilicato (TEOS) adquirido da Sigma-Aldrich® (EUA).

4.1.4 . Suportes Magnéticos

Na preparação do suporte de imobilização com propriedades magnéticas foram utilizados cloreto de ferro (III) Sigma-Aldrich® > 97% e cloreto de ferro (II) tetra-hidratado, Sigma-Aldrich®, 99%.

4.1.5. Outros reagentes

Outros reagentes utilizados foram: solventes (Cromoline, etanol 95% - Reagen, hexano-Cromoline, etanol - Vetec), peneira molecular 0,32 cm diâmetro (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals; hidróxido de sódio (Merck), álcool polivinílico (MM 72.000, Reagen), HCl (mínimo 36%, Isofar), epícloridrina (Sigma), polietilenoglicol

(MM 1500, Synth), goma arábica em pó pura (Sinthy) e óleo de oliva comercial baixo teor de acidez (Carbonell). Padrões cromatográficos (ésteres etílicos) obtidos da Sigma-Aldrich.

4.2. Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento deste trabalho estão apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/fabricante
Medidas de pH	Potenciômetro	TEC2, Tecnal (TECNAL)
Atividade hidrolítica	Retrotitador automático	794 BASIC TITRINO, Metrohm
Teor de umidade	Balança analítica	ID 50, Marte (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda)
Dosagem de ésteres etílicos	Cromatógrafo a gás	GC-3800Varian (Varian Inc. Corporate Headquarters)
Agitação	Agitador mecânico	RW20-Digital, IKA(IKA Laboratory Equipment)
Densidade	Densímetro	DMA 35N EX (Anton Paar)
Viscosidade Análise texturais	Viscosímetro BET	LVDVIIIICP-CP 520 (Brookfield) BELSORP-mini II
Raios-X	Raios-X	Shimadzu
Microscópio Eletrônico de Varredura	MEV	LEO1450VP
Espectrofotometria na região do Infravermelho	Espectrômetro no infravermelho	Modelo Spectrum GX, Perkin Elmer

4.3. Metodologia Experimental

4.3.1 Síntese do suporte híbrido

O composto híbrido constituído de polissiloxano e polivinilálcool (SiO₂-PVA) foi sintetizado, pela mistura de 5 mL tetraetilortosilicato (TEOS), 5 mL etanol 95% e 6 mL de

solução de álcool polivinílico (PVA) 2% (mv^{-1}). Essa mistura foi aquecida a 60 °C, sob agitação, com adição 100 μL de HCl concentrado (PAULA et al., 2008). Após um período de incubação de 40 min, a preparação foi mantida a 25 °C por 48 h até a completa solidificação (formação da rede interpenetrada de SiO_2 -PVA). O composto foi triturado e classificado, utilizando-se peneiras de análises granulométricas (Bronzinox) com 60 e 80 MESH, sendo recolhida a porção intermediária que ficou retida na peneira com malha de 80 MESH.

4.3.2. Síntese da magnetita: Processo de co-precipitação dos ions Fe^{+2} e Fe^{+3}

Em 300 mL de água ultra-pura (UP), previamente aquecida, adicionou-se 30 mL de uma solução de FeCl_2 0,6 M gota a gota sob forte agitação mecânica de 150 rpm, sendo que a cada gota adicionada esperava-se a homogeneização do meio. Em seguida, também sob agitação mecânica, foram adicionados, gota a gota, 30 mL da solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,1 M, novamente, a cada gota adicionada esperava-se a homogeneização do meio. A temperatura do meio racional foi ajustada para 65 °C com auxílio de placa de aquecimento e o pH ajustado para 11,0 por meio da adição lenta de NaOH 4M sob vigorosa agitação mecânica 150rpm.

O procedimento conduziu a formação de uma solução de coloração negra, a qual foi mantida por 30 min a 65 °C; pH 11,0 sob vigorosa agitação mecânica. O béquer com a mistura obtida (massa negra) permaneceu em repouso sobre um ímã (campo magnético externo) para auxiliar a separação das partículas magnetizadas. As partículas magnéticas ficaram depositadas na parte inferior do becher na forma de uma massa escura. O sobrenadante foi removido e o pH medido. Na massa negra foram efetuadas lavagens com água UP e com a mistura acetato de etila e água UP na proporção 1:1. As duas primeiras lavagens foram realizadas com 200 mL de água UP e as lavagens posteriores foram realizadas com a mistura 1:1 de acetato de etila e água UP de forma que o sobrenadante apresentasse pH 7,0. A massa negra com as partículas magnéticas foi levada à estufa a 60 °C por 18 h. O fluxograma do processo de obtenção das partículas magnéticas de magnetita e maghemita é ilustrado na Figura 4.1.

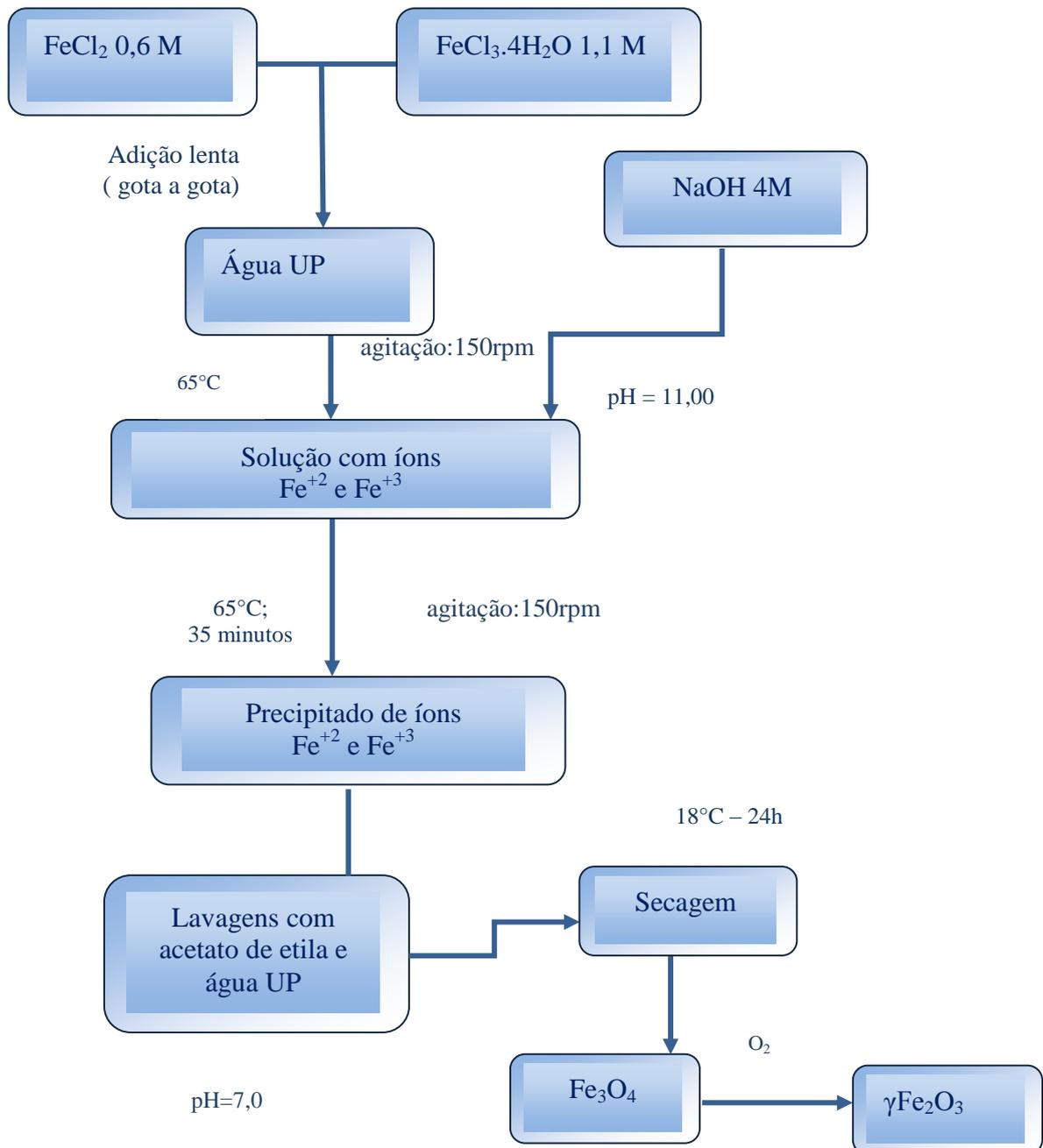


Figura 4.1. Fluxo do processo de co-precipitação dos íons Fe²⁺ e Fe³⁺.

4.3.3. Magnetização do suporte híbrido: Dopagem do suporte (SiO₂-PVA)

Preparou-se uma suspensão de 6 g de suporte híbrido (SiO₂-PVA) em 300 mL de água ultra-pura (UP) e, então o procedimento de co-precipitação dos íons Fe⁺² e Fe⁺³ descrito em 4.3.2 foi realizado na suspensão (SiO₂-PVA) em água UP, resultando no suporte SiO₂-PVA dopado com Fe⁺² e Fe⁺³.

4.3.4. Incorporação das partículas magnéticas na síntese do suporte híbrido

Preparou-se uma batelada de suporte híbrido SiO₂-PVA e após o período de reação de 40 min, adicionou-se ao meio reacional na razão de 1:8 (composto precipitado: suporte híbrido) o composto obtido pela co-precipitação de Fe⁺² com Fe⁺³ em NaOH. Desta forma, neste procedimento ocorreu à formação de sistema sol-gel contendo partículas magnetizadas, a preparação foi mantida a 25 °C por 48 h ou até a completa solidificação. O composto apresentou coloração negra e foi triturado até que passasse pela peneira padrão serie Tyler de 42 MESH e ficasse retida na peneira de 60 MESH.

4.3.5. Ativação dos suportes

Os suportes foram ativados com solução de epicloridrina 2,5% (vv⁻¹) em tampão fosfato de sódio (0,1 M e pH 7,5), na proporção 1 g de suporte para 10 mL de solução. Após a homogeneização, a mistura foi mantida sob agitação por 1 h à temperatura ambiente, em seguida submetida à filtração o vácuo em um funil de Buchner revestido com papel de filtro (diâmetro 28 µm) para retirar o excesso de umidade. Durante a filtração o suporte foi lavado exaustivamente com água destilada e solução tampão de fosfato, e em seguida levado à estufa (60 °C) por 24 h.

4.3.6. Imobilização de lipase de *Burkholderia cepacia* nos suportes sintetizados

Os suportes não ativados e ativados com epicloridrina foram utilizados para imobilizar a lipase *B.cepacia* por adsorção física e ligação covalente, respectivamente. Em uma relação (sólido:líquido) de 1:10, os suportes foram embebidos em hexano e mantidos sob agitação por 2 h em shaker (Modelo TE-420, Tecnal). Após este período, para cada grama de suporte (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase de *B.cepacia* na sua forma livre e 100 µL de solução aquosa contendo 5 mg mL⁻¹ de polietilenoglicol (PEG-1500). A suspensão contendo enzima, suporte e PEG-1500 foi homogenizada por suave

agitação com bastão de vidro, até a suspensão apresentar a formação de grãos de tamanhos irregulares, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C (PAULA et al., 2008).

A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração à vácuo em papel de filtro 100 mm de diâmetro, com lavagens sucessivas com hexano até a redução da umidade dos derivados imobilizados em valores não superiores 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 ($\eta\%$) foi calculado pela equação 4.1.

$$\eta(\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (4.1)$$

Em que: U_0 = unidades de atividade oferecida para imobilização enzima livre; U_s =unidades de atividade enzimática total presente no derivado imobilizado (massa seca do derivado imobilizado x atividade).

4.3.7. Síntese de ésteres alquílicos

As reações foram efetuadas em reatores de vidro cilíndrico (60 mm de altura e 40 mm de diâmetro interno) encamisados com capacidade de 50 mL, acoplados com condensador de refluxo sob agitação mecânica 150 rpm. As reações foram realizadas numa temperatura fixa de 45 °C, utilizando 20 gramas de meio reacional, com razão molar óleo/etanol de 1:8, em meio isento de solvente e lipase *B. cepacia* imobilizada nos diversos suportes, numa proporção de 500 unidades de atividade por grama de óleo de coco. O progresso da síntese foi acompanhado pela retirada de alíquotas, ao longo da reação. As concentrações de ésteres de alquila foram quantificadas por cromatografia em fase gasosa utilizando metodologia previamente estabelecida (URIOSTE et al., 2008).

4.3.8. Purificação dos ésteres

Após a separação do biocatalisador o volume do meio reacional foi medido e transferido para o funil de decantação com adição do mesmo volume de água destilada para a purificação dos ésteres etílicos. Na mistura do funil de decantação ocorreu uma agitação e a mistura ficou em repouso por 30 min para a separação das fases. A fase

inferior composta por glicerol e água de lavagem foi descartada e a fase superior, composta pelos ésteres de etila (biodiesel), foi submetida à centrifugação (1570 G por 15 min) e em seguida à evaporação em rota-evaporador para a retirada de etanol e água remanescentes. Posteriormente, foram adicionadas pequenas quantidades de sulfato de sódio anidro para finalizar a etapa de secagem. As amostras de biodiesel purificadas foram submetidas à análise dos parâmetros de viscosidade e densidade.

4.4. Métodos de Análise

4.4.1. Dosagem da umidade

A determinação do teor de umidade dos suportes e biocatalisadores foi feita medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (cerca de 0,1 g) em balança analítica acoplada com infravermelho durante 15 min a 100 °C.

4.4.2. Área superficial e volume de poros específicos

As medidas de áreas superficiais, volume de poros e distribuição de volume de poros das amostras dos suportes foram realizadas em um equipamento da marca BEL, modelo BELSORP-mini II, empregando-se a técnica de adsorção-dessorção física de nitrogênio a -196 °C. As amostras foram previamente tratadas *in situ* sob aquecimento à 100 °C por 3 h para retirar água e os gases adsorvidos na superfície e nos poros do sólido. A massa empregada de cada amostra foi entre 0,17 e 0,21g. Os resultados apresentaram erro máximo de ±5% do valor de área específica. A área superficial específica dos suportes foi calculada pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller, 1938) de multicamadas do gás nitrogênio adsorvido fisicamente a -196 °C na amostra. Para o cálculo do volume de poros, aplicou-se o método de BJH (Barrett, Joyner e Halenda, 1951) que utiliza a equação de Kelvin e assume o esvaziamento progressivo dos poros com o decréscimo da pressão. A equação resultante do método de BET é expressa conforme 4.2.

$$P/V(P_0-P) = 1/V_m c + [(c-1)/V_m c]P/P_0 \quad (4.2)$$

Em que:

c é a constante de BET dada pela equação 4.3

$$c = \exp [(Q_1 - Q_L)/RT] \quad (4.3)$$

V_m é o volume de gás adsorvido quando a superfície do sólido está completamente coberta por uma monocamada; V é o volume total de gás adsorvido; P é a pressão medida no estado de equilíbrio; P_0 é a pressão inicial do sistema; Q_1 é o calor de adsorção da primeira camada; Q_L é o calor molar de condensação; T é a temperatura absoluta; R é a constante universal dos gases perfeitos.

4.4.3. Difração de Raios-X (DRX)

A identificação estrutural das amostras foi realizada por medidas de difração de raios X. As análises de raios-X foram realizadas colocando as amostras sobre o suporte de alumínio e as análises foram efetuadas em intervalos angulares de 10 a 70 graus e tempo de contagem de 1 segundo, utilizando o difratômetro da marca Shimadzu, modelo XRD 6000. A técnica utilizada foi a difratometria de pó, a uma tensão de 40kV e uma corrente de 30 mA. A radiação utilizada foi $CuK\alpha$ com monocromador de grafite e comprimento de onda de 1,5418 Å.

4.4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As mudanças conformacionais, tais como cavidades nas superfícies do suporte, definidas pela inserção de agentes de ativação e a presença da enzima no suporte foram observadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As micrografias das superfícies dos suportes foram obtidas utilizando microscópio eletrônico de varredura LEO1450VP com EDS acoplado (Schott Zeiss do Brasil, SP, Brasil).

As amostras foram polvilhadas sobre fitas de carbono dupla-face, metalizadas com uma fina camada de ouro, previamente dispostas no porta-amostras. O microscópio foi operado na modalidade elétrons secundários e utilizando-se baixo vácuo.

4.4.5. Espectroscopia na região do Infravermelho (IV)

A espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi conduzida na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} usando cristais de KBr. O Espectrômetro utilizado foi modelo Spectrum GX, Perkin Elmer. As amostras foram analisadas pelo método de Transmissão, sendo medidos os valores de absorbância no intervalo de 400-4000 cm^{-1} . Foram feitas 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, pesou-se cerca de 2 mg da amostra seca e moída e adicionou-se a 200mg de KBr grau espectroscópico, seco a 105 °C

por 2 h. Macerou-se esta mistura até que fossem eliminados visivelmente todos os cristais, por cerca de 1min. A amostra macerada foi transferida para um molde pastilhador e prensada ($1,5 \text{ kgfcm}^{-2}$) sob vácuo por 5 min, formando então a pastilha para análise.

4.4.6. Determinação da densidade cristalina dos suportes

A densidade cristalina ou densidade do esqueleto sólido foi determinada em balão volumétrico de 10 mL previamente aferido com água à temperatura ambiente. Colocou-se uma massa conhecida de partículas no interior do balão e as mesmas foram imersas em água destilada sob vácuo, a fim de se eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. O balão volumétrico foi completado com água, sendo o volume ocupado pelo sólido obtido por diferença após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelos sólidos (FREITAS et al., 2010).

4.4.7. Determinação da atividade enzimática

Foram misturados 5 mL de uma emulsão de azeite de oliva (50% azeite: água) e 4 mL de pH tampão fosfato (pH 7,0; 0,1 M). A fim de garantir a homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação prévia, à 37 °C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 1 mL da solução enzimática ($0,5 \text{ mg mL}^{-1}$, preparada em solução tampão pH 7,0) ou 0,05 g do derivado imobilizado, mantendo-se o sistema reacional sob agitação, a 37 °C, por 5 min. Após o período de incubação, foram adicionados 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1: 1) e 10 mL de uma solução de KOH ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$). O excesso de KOH foi titulado com HCl ($0,05 \text{ mol.L}^{-1}$) utilizando-se um titulador automático, sendo o ponto de equivalência determinado empregando-se o modo “titulação dinâmica” do aparelho (DET, “Dynamic Equivalence point Titration”). A atividade foi calculada de acordo com a equação 4.4.

$$\textit{Atividade (U / g)} = \frac{(V_B - V_A) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot m} \quad (4.4)$$

Em que: V_B = volume do branco (mL); V_A = volume da amostra (mL); M = molaridade da solução de HCl; t = tempo de incubação (min); m = massa de biocatalisador adicionado (g).

4.4.8. Determinação dos parâmetros cinéticos da lipase livre e imobilizada

No cálculo da constante de Michaelis-Menten (K_m), foram preparados sistemas reacionais contendo ácidos graxos totais em concentrações variando entre 372 – 1860 mM, obtidos a partir de emulsões preparadas com diferentes proporções de azeite de oliva (10 – 50%) e solução aquosa de goma arábica (7% mv^{-1}). As velocidades iniciais das reações de hidrólise catalisadas pela lipase na forma livre e imobilizada foram determinadas de acordo com a metodologia de hidrólise do azeite de oliva descrita anteriormente no item 4.4.7. As constantes cinéticas (K_m e V_{max}) foram determinadas pelo Programa Enzymefitter (Leatherbarrow, R. J., 1987, Elsevier, Biosoft, Amsterdam, The Netherlands).

4.4.9. Determinação dos ésteres de etila

Os ésteres de etila formados na reação de transesterificação do óleo de coco com etanol foram quantificados empregando cromatógrafo de fase gasosa (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA), equipado com detector de chama ionizante e coluna empacotada de aço inoxidável do tipo 5% DEGS CHR-WHP 80/100 mesh 6ft 2.0mm ID e 1/8"OD (Restek, Frankel Commerce of Analytic Instruments Ltda, SP, Brasil). Nitrogênio foi usado como gás de arraste com fluxo de 25 $mL\ min^{-1}$. A coluna foi submetida a uma rampa de temperatura de 90 °C (3 min), 120 °C (10min) e 170 °C (15min), a uma taxa de aquecimento de 25 °C min^{-1} . A coleta de dados foi realizada utilizando o software Galaxie Chromatography Data System version 1.9. O volume de injeção da amostra foi de 1 μL contendo hexanol como padrão interno (URIOSTE et al., 2008).

4.4.10. Densidade dos ésteres de etila

Os valores de densidade foram determinados utilizando um densímetro digital Modelo DMA 35n EX (Anton Paar). As medidas foram feitas a 15 °C, empregando-se 2,0 mL das amostras purificadas.

4.4.11. Viscosidade dos ésteres de etila

Os valores da viscosidade absoluta foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltda, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram feitas em duplicata a 40°C, empregando 1 mL de amostra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização dos suportes magnetizados

5.1.1. Propriedades texturais dos suportes de imobilização

Os valores das áreas superficiais específicas e volumes de poros específicos das diferentes matrizes produzidas foram determinados por adsorção de um gás em equilíbrio, em condições isotérmicas utilizando o método B.E.T.

Com os resultados apresentados na Tabela 5.1, verifica-se que a matriz de partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ possui menor área superficial específica, bem como menor volume de poros específico, quando comparada as demais matrizes de SiO_2 -PVA magnética e não magnética. Esses dados são similares aos descritos por Tran et al., 2012 que verificou para a matriz Fe_3O_4 - SiO_2 área específica de $202 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ e volume de poros específico de $0,20 \text{ cm}^3\text{g}^{-1}$, valores similares aos encontrados na matriz de SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ estudada neste trabalho.

Comparando a matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ com a matriz não magnetizada (SiO_2 -PVA) observa-se que a adição de óxido de ferro na superfície da matriz polimérica ocasionou perda da área superficial específica, ou seja ocorreu uma diminuição da quantidade de grupos de sílica na superfície da matriz, indicando a interação entre as partículas magnéticas e a rede de sílica. No entanto, o volume de poros específico não sofreu interferência com a deposição do ferro na matriz.

A perda de área superficial específica ocorreu devido à alta energia de superfície das partículas magnéticas, a tensão interfacial agiu como uma força diretora para redução espontânea da área superficial específica pelo crescimento durante a etapa inicial de precipitação e durante a agitação (TARTAJ et al., 2005; SUGIMOTO et al., 1998). A funcionalização da superfície do SiO_2 -PVA através do método de co-precipitação leva ao decréscimo da área superficial específica (TARTAJ et al., 2005).

Para o suporte SiO_2 -PVA sintetizado com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ não houve redução de área superficial específica em relação ao suporte não magnetizado (SiO_2 -PVA) e a matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. Neste procedimento ocorre a incorporação das partículas magnéticas no meio gelatinoso, desta forma a agitação do meio e a tensão superficial são reduzidas, evitando a redução de área superficial específica do suporte.

Tabela 5.1. Propriedades texturais das matrizes magnetizadas e não magnetizada.

Suporte	Área superficial específica (m²g⁻¹)	Volume de poros específico (cm³g⁻¹)
SiO ₂ -PVA	396,5 ± 19,8	0,14
SiO ₂ -PVA dopada com Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃ .	224,0 ± 11,2	0,14
SiO ₂ -PVA sintetizada com Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃ .	481,0 ± 24,1	0,15
Partículas de Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃	49,0 ± 2,5	0,07

5.1.2. Densidade Cristalina

As matrizes de SiO₂-PVA magnética e não magnética apresentaram valores similares de densidade, o que indicou que a deposição de partículas de óxido de ferro na matriz polimérica de SiO₂-PVA não modificou significativamente a densidade da matriz original, conforme Tabela 5.2.

Verifica-se na Tabela 5.2 que dentre os suportes avaliados a maior densidade foi obtida para as partículas Fe₃O₄ e γFe₂O₃, de acordo com Harris, 2002 a magnetita e maghemita possuem densidade 5,26 e 4,87 g. cm⁻³, respectivamente. Na determinação da densidade cristalina, não se leva em conta os poros das partículas. Os métodos para medir a densidade dos sólidos são consideravelmente menos precisos, que para líquidos, devido à sua heterogeneidade, solubilidade parcial e presença de bolhas de ar (GRATUITO et al., 2007) esse fato explica os valores menores de densidade obtidos para as partículas Fe₃O₄ e γFe₂O₃.

Tabela 5.2. Valores de densidade cristalina dos diferentes suportes.

Matriz	Densidade (g. cm⁻³)
SiO ₂ -PVA	1,80 ± 0,10
SiO ₂ -PVA dopada com Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃	1,70 ± 0,10
SiO ₂ -PVA sintetizada com Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃	1,97 ± 0,14
Partículas de Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃	2,59 ± 0,20

5.1.3. Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de transmitância na região do infravermelho, mostrados na Figura 5.1, apresentaram uma banda larga na região de 3400 cm^{-1} com um ombro em 3250 cm^{-1} que foram atribuídas ao grupamento O-H de hidroxilas ligadas ao ferro ou a cadeia polimérica de SiO_2 -PVA o grupamento O-H é proveniente da água de hidratação e de cristalização (NYQUIST; KAGEL, 1997). A banda em 1630 cm^{-1} foi atribuída à deformação angular da água $\delta\text{H-O-H}$. As bandas em 600 a 500 cm^{-1} são atribuídas a Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ na ligação entre Fe-O-Fe. Observações de bandas representativas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ também foram relatadas por Wei et al., 2012; Xie et al., 2009.

Os espectros apresentados revelam ainda outras informações sobre estrutura química dos sistemas estudados. Com relação ao suporte SiO_2 -PVA, a banda correspondente à região 1000 - 1110 e 470 cm^{-1} evidencia estiramento assimétrico Si-O-R (RAMOS et al., 1998; ASSIS, 2003). Desta forma, a análise de FTIR sugere uma ligação de sílica nas partículas magnéticas.

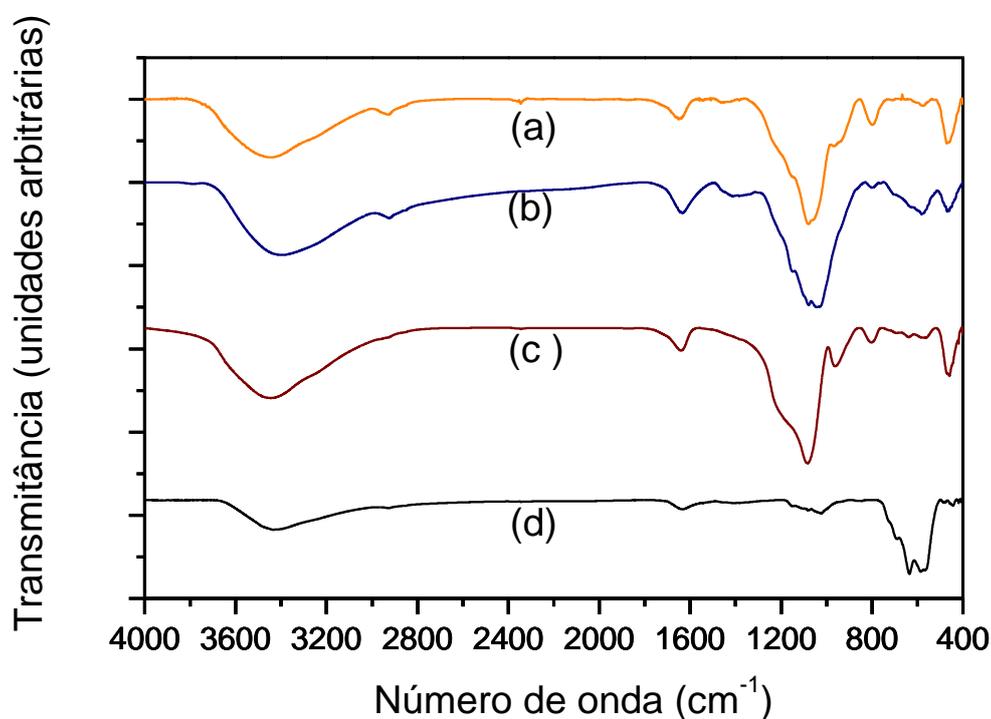


Figura 5.1. Espectros na região do infravermelho da matriz SiO_2 -PVA (a) linha laranja, matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 (b) linha azul, SiO_2 -PVA sintetizada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (c) linha vinho e partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (d) linha preta.

5.1.4. Difração de Raios-X

A caracterização estrutural foi realizada a partir da difração de raios-X, nesta técnica ocorre que uma frente de ondas passa através de fendas cuja separação é comparável ao comprimento de onda λ da radiação. A técnica de medida difração de raios-X é baseada na interação da radiação eletromagnética de comprimento de onda λ ($\approx 0,1$ nm) com planos de átomos do sólido cristalino.

Os materiais com arranjo cristalino e repetitivo apresentam difratogramas contendo picos e reflexões bem definidas. Por outro lado, os materiais amorfos não possuem um arranjo cristalino regular e, portanto não apresentam difratogramas com reflexões definidas (CULLITY, 2001).

Os difratogramas ilustrados na Figura 5.2 são referentes aos suportes híbridos (SiO₂-PVA) não-magnético e magnético e ao óxido de ferro. Os difratogramas obtidos a partir dos suportes magnetizados e SiO₂-PVA apresentam picos de baixa intensidade e com expressiva largura em 24° e 23° (2 θ) respectivamente, indicando formação de estruturas predominantemente amorfas pela presença da sílica (KIM et al., 2003). A formação de um microambiente amorfo mostra que os suportes são formados por uma rede não uniforme e com um número considerável de interstícios, ideal para o processo de imobilização de enzimas (FAN et al., 2006). Uma distribuição homogênea do componente orgânico na matriz inorgânica evita a formação de agregados de enzima, conforme constatado por Abbehausen et al., 2011.

Os suportes magnéticos apresentaram picos característicos de cristalinidade (curvas b e c) o que evidencia a precipitação dos óxidos no suporte de SiO₂-PVA. Comparando os difratogramas ilustrados na Figura 5.2 observou-se a formação de maghemita e de magnetita de acordo com a ficha JCPDF#19-0629 da Figura 5.3, porém com uma pequena variação no grau de cristalinidade entre uma amostra e outra. O grau de oxidação dos íons ferro determina a fase cristalina de obtenção do óxido de ferro. A variação no grau de cristalinidade reflete proporcionalmente no grau de magnetização para amostras de uma mesma composição, ou seja, quanto maior o grau de cristalinidade maior o grau de magnetização. Desta forma, o composto de óxido de ferro formado depende da forma de preparação matriz, ou seja, a preparação por síntese ou a dopagem influenciaram nas características físicas da amostra.

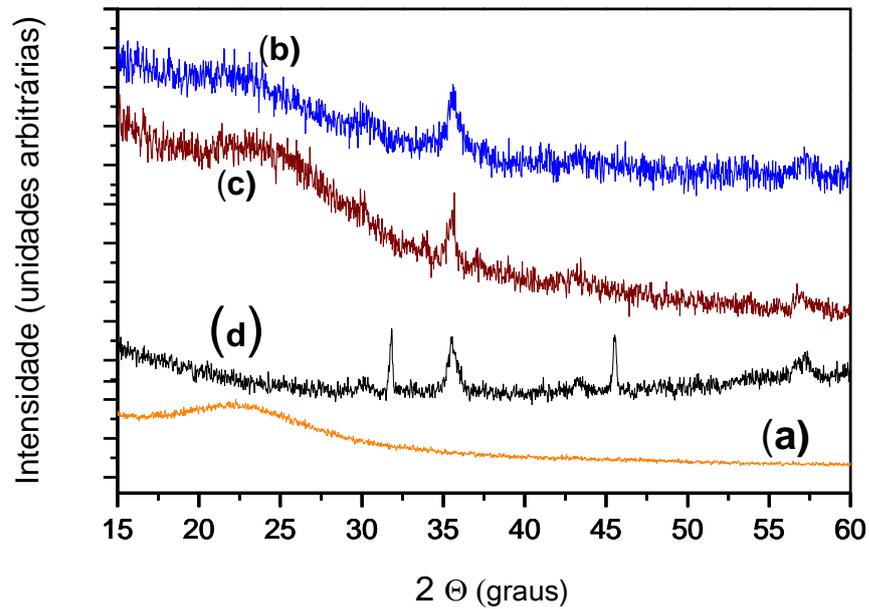


Figura 5.2. Difratoimetria de Raios X da matriz SiO₂-PVA (a) linha laranja, matriz SiO₂-PVA dopada com Fe₃O₄ (b) linha azul, SiO₂-PVA sintetizada com Fe₃O₄ e γFe₂O₃ (c) linha vinho e partículas de Fe₃O₄ e γFe₂O₃ (d) linha preta.

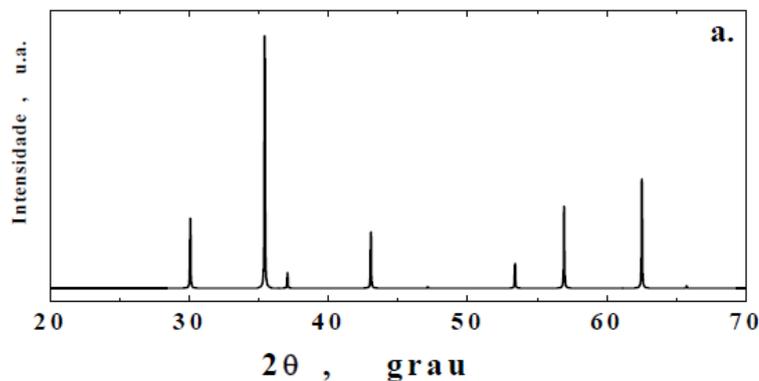


Figura 5.3. Curvas de difração de raios X: (a) ficha catalográfica da magnetita (JCPDS#19-0629), semelhante à maghemita.

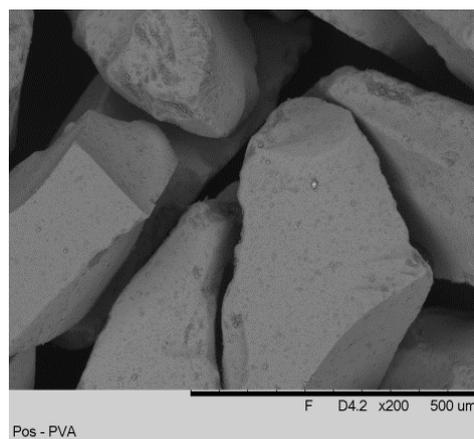
Tomando por base os dados descritos por Rahman et al., 2012, pode-se inferir que houve a incorporação da magnetita e maghemita nas matrizes, pois todos os difratogramas apresentaram o pico característico de difração em $2\theta = 35,70^\circ$ que corresponde à fase espinélio de partículas de Fe₃O₄. Segundo Mincheva et al., (2008) e Kim et al. (2003) picos

na posição de $30,0^\circ$, $35,5^\circ$, $43,1^\circ$, $53,4^\circ$, $57,0^\circ$ e 63° , como encontrados neste trabalho, são característicos de magnetita de fase cristalina.

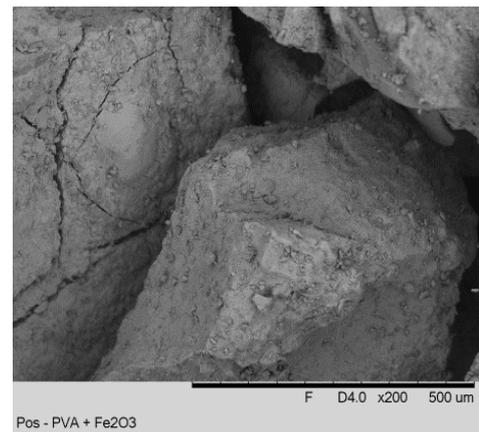
De forma generalizada, os difratogramas apresentaram picos estreitos e as resoluções das linhas espectrais apresentaram muito ruído. A forma e largura dos picos indicaram que há cristalinidade nas matrizes magnéticas e fase amorfa na matriz de SiO_2 -PVA.

5.1.5. Microscopia Eletrônica de Varredura

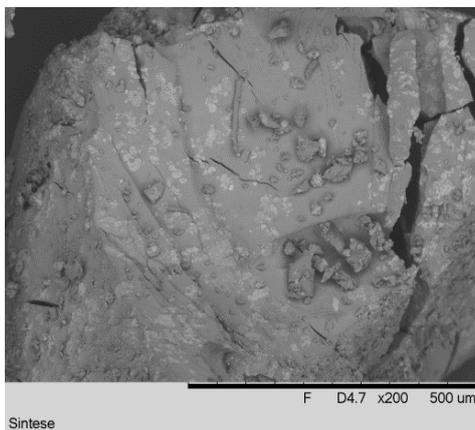
A microscopia eletrônica de varredura na ampliação de 200 vezes permitiu verificar as pequenas diferenças morfológicas entre os suportes (SiO_2 -PVA) não magnético, magnetizados e magnetita/maghemita (Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$).



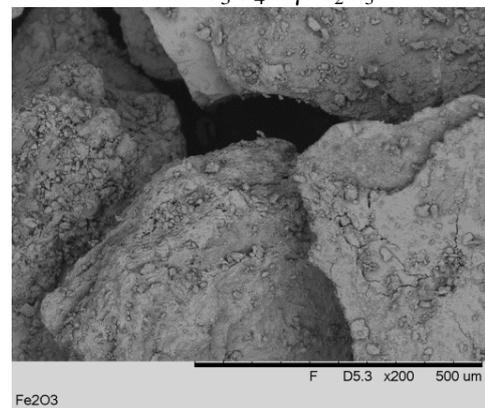
(a) Matriz (SiO_2 -PVA)



(b) Matriz SiO_2 -PVA dopada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$



(c) SiO_2 -PVA sintetizada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.



(d) Partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

Figura 5.4 (a-d). Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A heterogeneidade da forma das partículas foi atribuída à alta energia de atração superficial das partículas magnéticas. Os suportes (Figuras 5.4 a-d) possuem característica predominante amorfa. Os suportes magnetizados com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ possuem pequenos aglomerados cristalinos na superfície da matriz, conforme pode ser observado nas Figuras 5.4 (b-d), corroborando com os dados reportados por Yamamura et al., 2004.

5.2. Seleção do método de imobilização

A lipase de *Burkholderia cepacia* foi imobilizada nas matrizes por adsorção física e ligação covalente de acordo com os procedimentos descritos em 4.3.5. A Tabela 5.3 apresenta os resultados de atividade hidrolítica dos derivados imobilizados obtidos, bem como os valores de recuperação de atividade.

A imobilização da lipase de *B. cepacia* nos suportes não magnetizado e magnetizado forneceu valores similares de atividade hidrolítica, demonstrando que a magnetização não influenciou significativamente a interação suporte-enzima.

Pela análise dos resultados foi possível verificar que o procedimento por ligação covalente, forneceu valores mais elevados de atividade hidrolítica quando comparado ao processo por adsorção física. Verifica-se, portanto, que o método de imobilização por ligação covalente proporcionou maior recuperação de atividade para todas as matrizes testadas. Esses resultados são similares aos reportados por Garcia, 2013 referentes aos rendimentos de imobilização da lipase *B.cepacia* em nanopartículas magnéticas. Os valores de recuperação de imobilização por ligação covalente (97,48%) foram superiores aos obtidos por adsorção (86,14%).

A maior recuperação de atividade no processo de imobilização por ligação covalente pode ser atribuída a maior interação da enzima com o suporte, ou seja, maior número de enlaces entre enzima e suporte (VILLENEUVE et al, 2000). No processo de imobilização por adsorção física ocorre apenas à interação entre os grupos superficiais do suporte com grupos de superfície da enzima, através de atrações eletrostáticas ou dipolares (forças de van der Waals) ou ainda pontes de hidrogênio (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Desta forma, verifica-se que o método de imobilização por ligação covalente foi o procedimento mais adequado para preparar o biocatalisador imobilizado visando aplicação posterior na catálise de ésteres de etila, sendo, portanto, adotado nos experimentos seguintes.

Os valores do rendimento de imobilização foram superiores aos relatados na literatura nos quais a preservação da atividade foi de cerca de 50% na resolução da síntese enzimática de (RS)-1-fenil etanol pela lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em nanopartículas magnéticas utilizando a técnica de adsorção física (REBELO et al., 2010). A recuperação de atividade mais elevada foi constatada para a matriz SiO₂-PVA sintetizada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃.

Tabela 5.3. Parâmetros de imobilização da lipase *B. cepacia* em suportes magnetizados e não magnetizado por adsorção física e ligação covalente

Lipase imobilizada	Adsorção física		Ligação covalente	
	Atividade (Ug ⁻¹)	Recuperação (%)	Atividade (Ug ⁻¹)	Recuperação (%)
SiO ₂ -PVA	2208 ± 80	59,1	2804 ± 266	74,3
SiO ₂ -PVA dopada com Fe ₃ O ₄ e γ Fe ₂ O ₃	2431 ± 80	62,7	2919 ± 102	76,9
SiO ₂ -PVA sintetizada com Fe ₃ O ₄ e γ Fe ₂ O ₃	2797 ± 39	74,6	3224 ± 57	85,9
Fe ₃ O ₄ e γ Fe ₂ O ₃	2752 ± 40	73,1	3004 ± 358	80,5

Atividade da lipase livre= 14905 Ug⁻¹.

5.3. Determinação dos parâmetros cinéticos

Enzimas imobilizadas geralmente dificultam a transferência de massa dos reagentes para a superfície (difusão externa) e para os poros (difusão interna) provocando perda de afinidade com o substrato em relação à enzima livre (VILLEUNEVE et al., 2000).

Para verificar o efeito da concentração do substrato sobre a velocidade inicial da reação de hidrólise utilizou-se a lipase livre e os derivados imobilizados nas matrizes SiO₂-PVA não magnetizada; SiO₂-PVA magnetizada (dopada); SiO₂-PVA magnetizado (sintetizada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃) e partículas de Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃. A porcentagem de azeite de oliva na emulsão óleo e água foram variadas entre 10 a 60 % (mm⁻¹). Os ensaios foram realizados em pH 7,0 a 37 °C.

Tomando por base os valores de atividade hidrolítica (Ug⁻¹) para lipase *B. cepacia* imobilizada nas matrizes testadas para cada concentração de substrato e utilizando o Programa Enzyme fitter foram obtidos os parâmetros cinéticos K_m (mM) e V_{max} (Ug⁻¹), conforme apresentado na Tabela 5.4.

A lipase *B. cepacia* imobilizada em suporte não magnetizado SiO₂-PVA apresentou K_m = 811 ± 56 mM, enquanto que a lipase imobilizada em suporte (Si₂O-PVA) dopado com

Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ apresentou $K_m=909\pm 97\text{mM}$ e a lipase imobilizada em $\text{Si}_2\text{O-PVA}$ sintetizado com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ apresentou $K_m=1898 \pm 227\text{mM}$. O maior valor de K_m foi verificado para a lipase imobilizada em partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ ($K_m= 4751 \pm 1241 \text{ mM}$). Esses valores de K_m indicam mudança da afinidade da lipase pelo substrato, na forma imobilizada para todos os suportes testados.

Tabela 5.4. Valores de K_m e V_{max} obtidos a partir dos valores de atividade hidrolítica em função da concentração de substrato.

Lipase	$V_{max}(\text{Ug}^{-1})$	$K_m(\text{mM})$
Livre	16019 ± 749	400 ± 32
Imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$	3741 ± 140	811 ± 56
Imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ dopada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$	3995 ± 137	909 ± 97
Imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ sintetizada com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$	4360 ± 1669	1898 ± 227
Imobilizada em partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$	11900 ± 1382	4751 ± 1241

Esse comportamento é geralmente observado para enzimas imobilizadas em função dos efeitos de interação enzima e suporte e dependem do processo de imobilização. Três formas de interação podem ser distinguidas: (1) a ligação da proteína na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; (2) o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e (3) as propriedades do suporte, como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas que afetam o modo de ação da enzima (PAULA et al., 2008).

Verifica-se que as nanopartículas de óxido de ferro magnetita Fe_3O_4 e maghemita $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ atuaram no suporte híbrido de forma a reduzir a afinidade da enzima pelo substrato sugerindo limitação difusional do substrato devido à presença de óxido depositada na superfície do suporte ou incorporada ao suporte. A perda de afinidade pelo substrato foi mais crítica para o derivado imobilizado em partículas de ferro seguido do derivado imobilizado em $\text{SiO}_2\text{-PVA}$ sintetizado com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

5.4. Síntese de ésteres de etila por transesterificação

O desempenho dos biocatalisadores imobilizados pelo processo de ligação covalente foi testado na reação de transesterificação do óleo de coco utilizando etanol como agente acilante. Nesta série de ensaios, foi efetuado o monitoramento das reações em termos de ésteres etílicos formados em função do tempo de reação, conforme mostrado na Figura 5.5 (a-d) e Tabela 5.5.

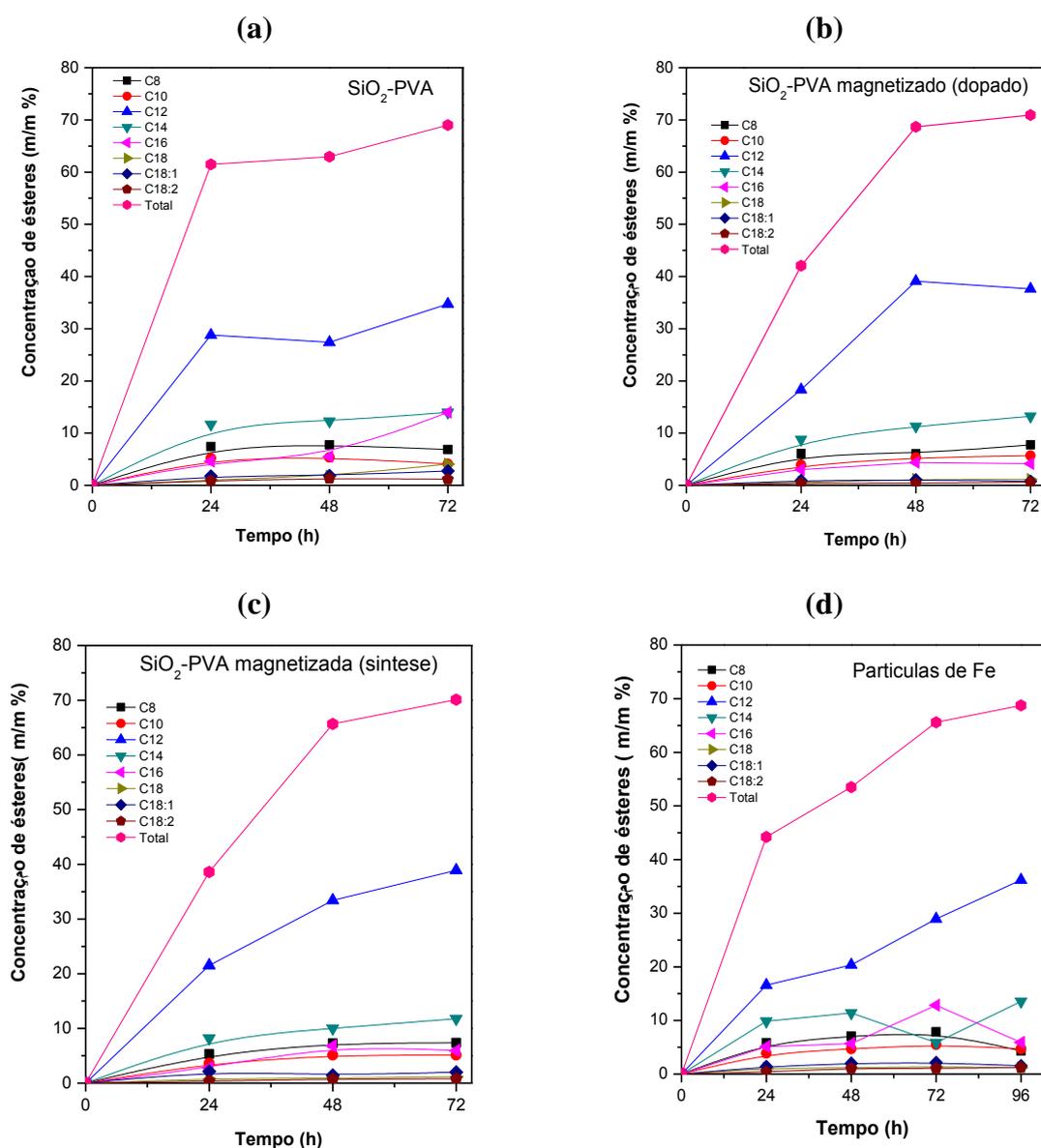


Figura 5.5. Perfil de formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de coco com etanol, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em diferentes suportes: (a) matriz SiO₂-PVA, (b) matriz SiO₂-PVA dopada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃, (c) matriz SiO₂-PVA sintetizada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃ e (d) partículas de Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃.

Com base nos resultados obtidos, verifica-se que independente do derivado imobilizado, as reações apresentaram similares perfis cinéticos com relação à formação dos ésteres de ácidos graxos presentes no óleo de coco, com destaque para os ésteres de laurato e miristato de etila, que são os ácidos graxos presentes em maior proporção nessa matéria-prima lipídica.

Na reação catalisada por lipase imobilizada em SiO₂-PVA não magnetizada o valor máximo obtido em concentração mássica de ésteres de etila foi da ordem de 69,02%, correspondendo a um rendimento de 99,9% em 72h (Figura 5.5a). Resultado similar foi obtido para a reação catalisada pela lipase imobilizada em SiO₂-PVA dopado com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃, cuja a conversão total de ésteres foi obtida em 72 h (Figura 5.5 b). O perfil de formação dos ésteres de etila para reação catalisada pelo derivado imobilizado em SiO₂-PVA sintetizada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃ indica menor velocidade de reação inicial, entretanto alcançando o equilíbrio estequiométrico em 72h (Figura 5.5 c). Por outro lado, o derivado imobilizado em partículas de Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃ (Figura 5.5 d) forneceu a menor velocidade de reação sendo necessário um período de 96h para alcançar o mesmo grau de conversão (99%).

Tabela 5.5. Formação dos ésteres de etila a partir da reação de transesterificação do óleo de coco com etanol, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em diferentes suportes: matriz SiO₂-PVA, matriz SiO₂-PVA dopada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃, matriz SiO₂-PVA sintetizada com Fe₃O₄ e γ Fe₂O₃ e partículas de Fe₃O₄ e γ Fe₂O.

		SiO ₂ -PVA	SiO ₂ -PVA dopada com Fe ₃ O ₄ e γ Fe ₂ O ₃ .	SiO ₂ -PVA sintetizada com Fe ₃ O ₄ e γ Fe ₂ O ₃	Partículas de Fe ₃ O ₄ e γ Fe ₂ O ₃
Octanóico	C8	6,84	7,76	7,39	4,34
Cáprico	C10	4,10	5,69	5,10	4,72
Láurico	C12	34,73	37,63	38,91	36,21
Mirístico	C14	13,95	13,20	11,79	13,53
Palmítico	C16	4,05	4,15	4,93	5,92
Esteárico	C18	1,41	1,12	1,16	1,21
Oléico	C18:1	2,74	0,75	1,99	1,53
Linoléico	C18:2	1,16	0,62	0,78	1,24
Total em ésteres (%)		69,02	70,10	70,94	68,75

Tran et al., 2012 realizaram a imobilização da *B. cepacia* em alkyl-Fe₃O₄-SiO₂ e relataram 92% de conversão do óleo de soja em ésteres evidenciando a eficiência da matriz magnética no processo de imobilização de enzimas para a produção de ésteres alquílicos.

Diversas lipases na forma imobilizada tem sido utilizadas para a produção de biodiesel com relativo sucesso como, por exemplo, Novozym 435 (derivada a partir de *Candida antarctica*) imobilizada em resina acrílica (SHIMADA et al., 1999), *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em Fe₃O₄ (XIE; MA, 2010) e lipases produzidas a partir de *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas cepacia* imobilizadas em polipropileno macroporos (SALIS; MONDUZZI; SOLINAS, 2007).

A Tabela 5.6 apresenta as propriedades das amostras de biodiesel purificadas. Conforme pode ser observado, os valores de viscosidade, densidade e teor de ésteres obtidos atendem as especificações da ANP para uso como combustível. Estes resultados indicam a potencialidade de produção do biodiesel pelo processo proposto neste trabalho.

Tabela 5.6. Propriedades das amostras de biodiesel obtidas da reação de transesterificação do óleo de coco com etanol, catalisada pela lipase *B. cepacia* imobilizada em diferentes suportes.

ANP	SiO ₂ -PVA	SiO ₂ -PVA dopado com Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃	SiO ₂ -PVA sintetizado com Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃	Fe ₃ O ₄ e γFe ₂ O ₃
Teor de éster (%)	94,3	99,9	100	99,5
Viscosidade (mm²s⁻¹)	3,9- 5,6	3,76	3,86	3,93
Densidade (kg m⁻³)	800-950	876	873	874

Além disso, a possibilidade de recuperação do biocatalisador por campo magnético para uso em bateladas consecutivas pode tornar o processo atrativo economicamente, reduzindo o custo operacional. Verifica-se que os valores de viscosidade cinemática obtidos estão coerentes com os respectivos valores de rendimento de transesterificação. Sabe-se que maiores conversões correspondem a menores viscosidades (MOREIRA et al, 2007).

Esses resultados também revelam que o sistema imobilizado utilizado não foi suscetível aos efeitos de inibição normalmente observados para lipases de diferentes fontes em meios altamente polares, como os meios reacionais constituídos por etanol (URIESTE et al., 2004; MOREIRA et al, 2007).

6. CONCLUSÕES

Partículas de óxido de ferro tipicamente são magnetita Fe_3O_4 e maghemita $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, e apresentam propriedades adequadas para a aplicação em processos biocatalíticos, em particular para imobilização de enzimas. Óxidos magnéticos foram incorporados na matriz híbrida SiO_2 -PVA por dopagem e por síntese com Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$. A eficiência das matrizes magnéticas na imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foi comparada com a matriz híbrida não magnética (SiO_2 -PVA) e com as partículas de Fe_3O_4 e $\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$.

- O processo de co-precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3} em solução alcalina resultou em partículas em forma de pó de coloração preta que exibiram magnetização quando expostas a um campo magnético.

- A caracterização das matrizes magnéticas, por técnicas de B.E.T., Difração de raios-X, microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia na região do infravermelho, indicou a presença o óxido de ferro (magnetita e maghemita) incorporado na matriz de (SiO_2 -PVA), tanto no processo de dopagem quanto no processo de síntese.

- Os suportes foram empregados para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* por adsorção física e ligação covalente. A recuperação de atividade no processo de imobilização por ligação covalente foi superior se comparado ao procedimento por adsorção física. A metodologia de incorporação das partículas magnéticas na matriz SiO_2 -PVA, processo de síntese, apresentou o melhor resultado de recuperação de atividade (85,9%).

- Os resultados obtidos com relação aos parâmetros cinéticos sugerem que a lipase *B. cepacia* imobilizada em suporte híbrido magnetizado apresentou menor afinidade pelo substrato do que no suporte híbrido não magnetizado. Isto pode ser evidenciado pelos valores encontrados de K_m , em que o maior valor encontrado para lipase imobilizada em suporte magnetizado com Fe^{+2} e Fe^{+3} ($K_m=1025\pm 945$) quando comparado com a lipase *B. cepacia* imobilizada em suporte híbrido (SiO_2 -PVA) não magnetizado ($K_m=811\pm 56$ mM).

- O processo de transesterificação enzimática do óleo de coco utilizando os derivados imobilizados demonstrou potencial para a produção do biodiesel. As reações de transesterificação forneceram resultados promissores atingindo conversão total dos triglicerídeos em ésteres de etila. As amostras do produto purificado apresentaram valores de viscosidade (3,76 a 3,93 mm^2s^{-1}) e densidade (876 a 873 kg m^{-3}) que atendem os requisitos da ANP para uso como biocombustível.

REFERÊNCIAS

- ABBEHAUSEN C.; FORMIGA A. L. B.; SABADINI E.; YOSHIDA I. V. P. A β -Cyclodextrin/ siloxane hybrid polymer: synthesis, characterization and inclusion complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.21, p.1867-1876, 2010.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Review**, v.42, p. 6406-6436, 2013.
- ATANASIJEVIC, T., SHUSTEFF, M., FAM, P., JASANOFF, A. Calcium-sensitive MRI contrast agents based on superparamagnetic iron oxide nanoparticles and calmodulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 103, p. 14707-14712, 2006.
- AMMAR, S., HELFEN, A., JOUINI, N., FIÉVET, F., ROSENMAN, I., VILLAIN, F., MOLINIÉ, P., DANOT, M. Magnetic properties of ultrafine cobalt ferrite particles synthesized by hydrolysis in a polyol medium. **Journal of Materials Chemistry**, v.11, p. 186-192, 2001.
- ANDRADE, A. M., PASSOS, P. R. A.; MARUQUES, L. G. C.; OLIVEIRA, L. B.; VIDAURRE, G. B.; ROCHA, J. D. S. Pirólise de resíduos do coco-da-baía (*Cocos nucifera* Linn) e análise do carvão vegetal. **Revista Árvore**, Viçosa, v. 28, p. 707-714, 2004.
- ANP. Produção de biodiesel. Disponível em [http:// www.anp.gov.br](http://www.anp.gov.br) Acesso em 14 de outubro de 2013.
- ARAÚJO, G. S. **Produção de biodiesel a partir de óleo de coco** (*Cocos nucifera* L.). (Dissertação de Mestrado)-2008, UFRN, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Área de concentração: Engenharia de Processos. Natal, RN, Brasil.
- ASSIS, O. B. G. Scanning electron microscopy study of protein immobilized on SiO₂ sol-gel surfaces. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.20, p.339-342, 2003.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA A. L.; MALCATA F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v.18, p.392-416, 1996.
- BARRET, P.; JOYNER, L. G.; HALENDA P. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the American Chemical Society**, v. 73, p. 373–380, 1951.
- BASUMATARY, S. Transesterification with heterogeneous catalyst in production of biodiesel: A review. **Journal of Chemical Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 1-7, 2013.
- BLASKOV, V.; PETROV, V.; RUSANOV, V.; MARTINEZ, L I. M.; MARTINEZ, B.; MUÑOZ, J.S.; MIKHOV, M. Magnetic properties of nanophase CoFe₂O₄ particles. **Journal Magnetism and Magnetic Materials**, v. 162, p. 331-337, 1996.
- BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers, **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, p. 309 - 319, 1938.

BRUNSCHWING, C., MOUSSAVOU, W., BLIN, J., Use of bioethanol for biodiesel production. **Progress in Energy and Combustion Science** v.38, p.283–301, 2012.

BUJOREANU, V. M.; SEGAL, E. On the dehydration of mixed oxides powders coprecipitated from aqueous solutions. **Solid State Sciences**, v.3, p. 407-415, 2001.

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 and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 2005.

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, p. 189-199, 2004.

CAMILO, R.L. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano 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.

CARVALHO, A. K. F. **Síntese de biodiesel por transesterificação pela rota etílica: comparação de catalisadores heterogêneos**. 2011. 105p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2011.

CARDOSO, L.H.G. **Nanopartículas magnéticas de ferritas mistas de cobalto e zinco**. 2011. 109p. Tese (Doutorado) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2011.

COSTA SILVA, W.; TEIXEIRA, L. F.; CARVALHO, A. K. F.; MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F. Influence of feedstock source on the biocatalyst stability and reactor performance in continuous biodiesel production. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.20, p.881-886, 2014.

CULLITY, B. D., GRAHAM, C.D., **Introduction to magnetic materials**, 2nd Ed, WILEY, 2009. 568 p. ISBN: 978-1-118-21149-6.

CULLITY, B. D.; STOCK, S.R., STOCK, S. **Elements of X ray Diffraction** – 3rd Ed, Prantice Hall, New York: 2001.664 p. ISBN 10: 0201610914, ISBN-139780201610918.

DA RÓS, P. C. M.; SILVA, G. A. M.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Evaluation of the catalytic properties of *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 5508–5516, 2010.

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; FREITAS, L; SANTOS, J. C. Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: MARSAIOLI, A. J.; PORTO, A. L. M. **Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e aplicação**. Salto, Brasil: Schoba, 2010, v. 1, p. 275-31.

DE CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; SÁ-FERREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Ed Interciência; UFRJ: CAPES: FAPERJ, cap. 6, p. 123-151, 2008.

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.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Review**, v.42, p. 6437-6474, 2013.

DIEGUES, T. G.; FELINTO, M. C. F. C.; CAMILO, R. L.; YAMAMURA, M.; SAMPAIO, L. C.; BRITO, G. E. S. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de manganês dopadas com Eu^{3+} . In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIAS DOS MATERIAIS, 2006. Disponível em: <http://www.metallum.com.br/17cbecimat/resumos/17cbecimat-209-021.pdf>. Acesso em: 26 de agosto de 2012.

DORS, G.; FREITAS, L.; MENDES, A. A.; FURIGO, JR, A.; DE CASTRO, H. F. Transesterification of palm oil catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* lipase in a packed-bed reactor. **Energy and Fuels**, v. 26, p. 5977-5982, 2012.

DUARTE, E.L. **Síntese e caracterização de nanopartículas baseadas em óxidos de ferro**. 2005. 147p. Tese (Doutorado) Instituto de Física – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

FAN, L.; DU, Y.; ZHANG, B.; YANG, J.; ZHOU, J.; KENNEDY, J. F. Preparation and properties of alginate/carboxymethyl chitosan blend fibers. **Carbohydrate Polymers**, v.65, p. 447–452, 2006.

FANGKANGWANWONG, J.; YOKSAN, R.; CHIRACHANCHAI, S. Chitosan gel formation via the chitosan–epichlorohydrin adduct and its subsequent mineralization with hydroxyapatite. **Polymer**, v. 47, p. 6438-6445, 2006.

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K.V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, p.1298-1315, 2008.

FREITAS, L., SANTOS, J. C., ZANIN, G. M., DE CASTRO, H. F. Packed-bed reactor running on babassu oil and glycerol to produce monoglycerides by enzymatic route using immobilized *Burkholderia cepacia* lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, p. 372-381, 2010.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interesterification of babassu oil (*Orbinyasp*). **Process Biochemistry**, v. 44, p. 1068-1074, 2009.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils- Review. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, n. 5, p. 405-416, 2001.

GARCIA, L. C. **Imobilização de lipase em nanopartículas magnéticas e em nanocompósitos magnéticos para a aplicação em reações de biotransformação.** 46p. 2013. Dissertação de Mestrado. Universidade Tiradentes, Sergipe – Aracaju, 2013.

GRATUITO, M. K. B.; PANYATHANMAPORN, T.; CHUMNANKLANG, R. A.; SIRINUNTAWITTAYA, N.; DUTTA, A. Production of activated carbon from coconut Shell: Optimization using response surface methodology, **Bioresource Technology**, v.99: p.4887- 4895, 2007.

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

GOMES, F. M.; PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H.F. Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 2, p. 17-23, 2004.

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

GUISÁN, J.M. Immobilization of enzymes for use in organic media, In: Guisan JM editor. **Immobilization of Enzymes and Cells.** Totowa: Humana Press: 2006. 449p. ISBN 1-58829-290-8.

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, v.27, p.782-798, 2009.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v.38, p.453-468, 2009.

HANNICKEL, A. **Estudo de nanopartículas de magnetita obtidas pelos métodos de coprecipitação, biossíntese e moagem.** 2011. 117p. Dissertação (Mestrado) - Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro-RJ, 2011.

HARRIS, L.A. **Polymer stabilized magnetite nanoparticles and poly (propylene oxide) modified styrene–dimethacrylate networks.** 2002. 161p. Thesis (Doctor of Philosophy in Chemistry), Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2002.

HOLLAND, H; YAMAURA, M. **Synthesis of magnetite nanoparticles by microwave irradiation and characterization.** In: International Latin American Conference on Powder Technology, Atibáia-SP, 2009. Disponível em: <http://www.metallum.com.br/ptech2009>. Acesso em: 12 dezembro de 2013.

INGERSOLL, C.M.; BRIGHT, F.V. Using sol–gel-based platforms for chemical sensors. **Chemtech**, v. 27, p.26–31, 1997.

JANASI, S.R., EMURA, M., LANDGRAF, F.J.G.; RODRÍGUEZ, D. The effects of synthesis variables on the magnetic properties of coprecipitated barium ferrite powders. **Journal of Magnetism and Magnetical Material**, v. 238, p. 168-172, 2002.

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

JIANG, J. J.; TAN, C.S. Biodiesel production from coconut oil in supercritical methanol in the presence of cosolvent. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.43, p. 102–107, 2012.

JEGANNATHAN K.R.; ABANG S.; PONCELET D.; CHAN E.S.; RAVINDRA P. Production of biodiesel using immobilized lipase. **Critical Review in Biotechnology**, v. 28, p. 253-64, 2008.

JOLIVET, J-P.; TRONC, E.; CHANÉAC, C. Iron oxides: from molecular clusters to solid. A nice example of chemical versatility. **Compte Rendue Geoscience** v. 497, p.338-488, 2006.

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.

KAZLAUSKAS, R. J., BORNSCEUER, U. T. **Biotransformation with Lipases**, In: REHM HJ, PIHLER G., STADLER A., KELLY P.J. W. (editors). **Biotechnology**, New York, 1998. v. 8, p. 37-192, 1998.

KIM, K.D.; MIKHAYLOVA, M.; ZHANG, Y.; MUHAMMED, M. Protective coating of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, **Chemistry Materials**, v.15; p.1617-1627, 2003.

KNOTHE, G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structures of fatty acid alkyl esters. **Fuels Processing Technology**, v.86, p.1059-1070, 2005.

LAM, M.K.; LEE, K.T.; MOHAMED, A.R. Homogeneous, heterogeneous and enzymatic catalysis for transesterification of high free fatty acid oil (waste cooking oil) to biodiesel: a review. **Biotechnology Advances** v.28, p.500–518, 2010.

LIU, X. M.; FU, S.-Y.; XIAO, H.-M.; HUANG, C.-J. Synthesis of nanocrystalline spinel CoFe_2O_4 via a polymer-pyrolysis route. **Physics B**, v. 370, p. 14-21, 2005.

LIU, Z.; LI, Z.; ZHOU, H.; WEI, G.; SONG, Y.; WANG, L. Immobilization and condensation of DNA with γ -aminopropyltriethoxysilane studied by atomic force microscopy. **Journal of Microscopy**, v. 218, p.233-239, 2005.

LIU, W. T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. **Journal of Bioscience Bioengineering**, v. 102, p.1-7, 2006.

LIU, C. H.; LIN, Y. H.; CHEN, C. Y.; CHANG, J. S. Characterization of *Burkholderia* lipase immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.40, p.359-363, 2009.

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

MACARIO, A.; MOLINER, M.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Increasing stability and productivity of lipase enzyme by encapsulation in a porous organic-inorganic system. **Microporous and Mesoporous Materials**, v.118, p. 334-340, 2009.

MAITY, D.; AGRAWAL, D. C. Synthesis of iron oxidenanoparticles under oxidizing environment and their stabilization in aqueous and non-aqueous media. **Journal Magnetism and Magnetic Materials**, v.308, p.46-55, 2007.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSON, C.H. Immobilized lipase reactors for modification of fats and oils- A review. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 67, n. 12, p. 890-910, 1990.

MARTINS, C. R.; JESUS JUNIOR, L. A. **Evolução da Produção de Coco no Brasil e o comércio internacional – Panorama**. Aracajú: Documentos/ Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. 164p. ISSN 15171329.

MASIEIRO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos Alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v.51, n.2, p. 60-79, 2008.

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.

MEHER, L. C.; VIDYA-SAGAR, D.; NAIK, S. N. Technical aspects of biodiesel production by transesterification – a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, p. 248-268, 2006.

MENDES, A. A.; BARBOSA, B.C.M.; SILVA, M. L. C. P.; CASTRO, H.F. Morphological, biochemical and kinetic properties of lipase from *Candida rugosa* immobilized in zirconium phosphate. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 25, p. 393-400, 2007.

MENDES A.A., FREITAS L., DE CARVALHO A.K., DE OLIVEIRA P.C., DE CASTRO H.F. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, v.2011, p.1-8, 2011.

MINCHEVA, R.; STOILOVA, O.; PENCHEV, H.; RUSKOV, T.; SPIROV, I.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I. Synthesis of polymer-stabilized magnetic nanoparticles and fabrication of nanocomposite fibers thereof using electrospinning, **European Polymer Journal**, v.44; p.615-627, 2008.

MOREIRA, A. B. R., PEREZ, V. H., ZANIN, G. M., DE CASTRO, H. F. Biodiesel synthesis by enzymatic transesterification of palm oil with ethanol using lipases from several sources immobilized on silica-PVA composite. **Energy and Fuels**, v. 21, p. 3689-3694, 2007.

MURUGESAN, A.; UMARANI, C.; SUBRAMANIAN, R.; NEDUNCHEZHIAN, N. Biodiesel as an alternative fuel for diesel engines –A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. v. 13, p. 653-662, 2009.

NASSAR, E. J.; MESSADDEQ, Y.; RBEIRO, S. J. L. Influência da catálise ácida e básica na preparação da sílica funcionalizada pelo método sol-gel; **Química Nova**, vol. 25, p.27-31, 2002.

NDT EDUCATION RESOURCE CENTER, Hysteresis Loop. Disponível em: www.ndted.org/educationresources/communitycollege/magparticle/physics/hysteresisloop.htm, acesso em, 20/12/2013.

NERI, D. F. M. **Immobilization of β -galactosidase onto different water insoluble matrices**. 2008. Tese (Doutorado) - Universidade de Minho, Portugal.

NGO, T. P. N.; LI, A.; TIEW, K.W.; LI, Z. Efficient transformation of grease to biodiesel using highly active and easily recyclable magnetic nanobiocatalyst aggregates biomass and bioenergy, **Bioresource Technology**, v.34, p. 890-896, 2010.

NYQUIST, R.A.; KAGEL, R.O. **Infrared spectra of inorganic compounds**: (3800-45 cm^{-1}). 3rd Ed. New York, United States of America: Academic Press Inc, 1997. ISBN 0-12-523447-3.

PAULA, A.V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J.C.; DE CASTRO, H.F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 281-288, 2007.

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

PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Kinetic studies of lipase from *Candida rugosa*. A comparative study of the free and the immobilized enzyme on porous chitosan beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 91-93, 739-752, 2001.

PEREZ, V. H.; SILVA, G. S.; GOMES, F.M.; DE CASTRO, H. F. Influence of the functional activating agent on the biochemical and kinetic properties of *Candida rugosa* lipase immobilized on chemically modified cellulignin. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, p. 13-19, 2007.

PILLAI, V.; KUMAR, P.; HOU, M. J.; AYYUB, P.; SHAH, D. O. Preparation of nanoparticles of silver halides, superconductors and magnetic materials using water in oil microemulsions as nano reactors. **Advances Colloid Interface Science**, v. 55, p. 241-269, 1995.

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

POUSA, G. P. A. G.; SANTOS, A. L. F.; SUAREZ, P. A. Z. History and policy of biodiesel in Brazil. **Energy Policy**, v.35, p. 5393-5398, 2007.

RAHMAN, O.; MOHAPATRA, S. C.; AHMAD, S. Fe_3O_4 inverse spinal super paramagnetic nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v.132, p.196-202, 2012.

RAMOS, M. A., GIL, M. H.; SCHACHT, E.; MATTHYS, G.; MONDELAERS, W.; FIGUEIREDO, M. M. Physical and chemical characterisation of some silicas and silica derivatives. **Powder Technology**, v. 99, p.79-85, 1998.

RAMOS, L. P.; DOMINGOS, A. K.; KUCEK, K. T.; WILHELM, H. M. Biodiesel: Um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Biociência: Ciência e Desenvolvimento**, v. 31, p. 28-37, 2003.

REBELO, L. P. **Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nano partículas magnéticas e sua aplicação em resolução cinética de alcoóis secundários quirais**. 2009. 191p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo-SP.

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

REETZ, M. T. Practical protocols for lipase immobilization via sol-gel techniques. In: Guisan JM editor. **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press: 2006. p.65-76, cap. 6.

RIBEIRO, B. D.; CASTRO, A. M.; COELHO, M. A. Z.; FREIRE, D. M. G. Production and use of lipases in bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 2011.

SALIS, A.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V. **Use of lipases for the production of biodiesel**. In: POLAINA, J.; MACCABE, A. P. Industrial Enzymes: Structure, function and application. Valencia: Springer, Cap. 19, p.317-339, 2007.

SANTOS, J. C.; PAULA, A. V.; ROCHA, C. G. F.; NUNES, G. F. M.; DE CASTRO, H.F. Morphological and mechanical properties of hybrid matrices of polysiloxane-polyvinyl alcohol prepared by sol-gel technique and their potential for immobilizing enzyme. **Journal of Non-Crystalline Solids**, v. 354, p. 4823-4826, 2008.

SAVAGE, N., DIALLO, M. S. Nanomaterials and water purification: Opportunities and challenges. **Journal of Nanoparticle Research**, v.7, p.331-342, 2005.

SCHMID, A.; HOLLMAN, F.; PARK, J. B.; BUHLER, B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. **Current Opinion in Biotechnology**. v.13, p. 359-366, 2002.

SHIMADA, Y., WATANABE, Y., SAMUKAWA, T., SUGIHARA, A., NODA, H., FUKUDA, H., TOMINAGA, Y. Conversion of vegetable oil to biodiesel using immobilized *Candida antartica* lipase. **Journal of the American Oil Chemists Society**. v.76, p.789-793, 1999.

SHARMA, R., CHISTI, Y, BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 627-662, 2001.

SILVA, P. R. F; FREITAS, T. F. S. Biodiesel: O onus e o bonus de produzir combustível. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.38, p.843-851 2008.

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, p.33-38, 2011.

SLUSZZ, T; MACHADO, J. A. D. Características das potenciais culturas matérias-primas do biodiesel e sua adoção pela agricultura familiar. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6, 2006, Campinas. **Anais...**, 2006, p. 1-10.

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.

SINGH S. P.; SINGH, D. Biodiesel production through the use of different sources and characterization of oils and their esters as the substitute of diesel: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p. 200-216, 2010.

STAMENKOVIC, O. S.; VELICKOVIC, A. V.; VELJKOVIC, B. V. The production of biodiesel from vegetable oils by ethanolysis: current state and perspectives. **Fuel**, v. 90, p.3141–3155, 2011.

SUAREZ, P. A. Z.; SANTOS A. L. F.; RODRIGUES, J. P.; ALVES, B. M. Biocombustíveis a partir de óleos e gorduras: Desafios tecnológicos para viabilizá-los. **Química Nova**, v.32, p.768-775, 2009.

SUGIMOTO, T.; SHIMOTSUMA, Y.; ITOH, H. Synthesis of uniform cobalt ferrite particles from a highly condensed suspension of β -FeOOH and β -Co(OH)₂ particles. **Powder Technology**, v. 96, p.85-89, 1998.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F., Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, v.28, p.628–634, 2010.

TARTAJ, P., MORALES, M. P., GONZÁLES-CARREÑO, T., VEITEMILLAS-VERDAGUER, S., SERNA, C. J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications, **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.34, p.290-291, 2005.

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

URIOSTE, D. CASTRO, M. A. B., BIAGGIO, F. C., DE CASTRO, H. F. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de métodos para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presentes no biodiesel a partir do óleo de babaçu. **Química Nova**, v.31, p.407-412, 2008.

VIJAYALAKSHMI, A., TARUNASHREE, Y., BARUWATI, B., MANORAMA, S. V., NARAYANA, B. L., JOHNSON, R. E. C., RAO, N. M. Enzyme field effect transistor (enfet) for estimation of triglycerides using magnetic nanoparticles. **Biosensors and Bioelectronics**. v.23, p.1708-1714, 2008.

VERMA, M. L., COLIN, J. B., PURI, M. Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilization and stabilization with potential application in biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.39, p.97-103, 2013.

VILLENEUVE, P; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J. M.; 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.

VULFSON, E.N. Industrial applications of lipases In: Woolley, P.; Petersen, S.B. (eds).; **Lipase: Their structure, biochemistry and application**, Cambridge University Press, Great Britain, 1994, p.271-288.

WEI, Y.; HAN, B.; HU, X.; LIN, Y.; WANG, X.; DENG, X. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties, **Procedia Engineering**, 27; 632-637, 2012.

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.; MA, N. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. **Biomass and Bioenergy**, v.34, p. 890–896, 2010.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.23, p.438-450, 1998.

YMAMURA, M; CAMILO, R. L.; FELINTO M.C.F.C. Synthesis and performance of organic-coated magnetical particles **Journal of Alloys and Compounds**, v.344, p.152-156, 2002.

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

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. p. 35-85.

ZHANG, W. X., Nanoscale iron particles for environmental remediation: An overview. **Journal of Nanoparticle Research**, v.5, p. 323-332, 2003.