



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* (TLL) EM NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS: EFEITO DA MODIFICAÇÃO DA SUPERFÍCIE DO SUPORTE

R. M. BEZERRA¹, J. C. S. DOS SANTOS², D. M. ANDRADE NETO³, W. S. GALVÃO³, P. B. A. FECHINE³, L. R. B. GONÇALVES¹

¹Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

²Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, UNILAB

³Universidade Federal do Ceará, Departamento de Físico-Química e Química Analítica

E-mail para contato: rayannemb12@gmail.com

RESUMO – A Lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) foi imobilizada em nanopartículas superparamagnéticas (NPM) de ferro (Fe_3O_4) visando a fácil recuperação do biocatalisador, por exemplo, pela aplicação de um campo magnético. Para se avaliar a influência da superfície do suporte na atividade do catalisador, as NPM foram modificadas pelo recobrimento com γ -aminopropiltriétoxissilano (APTES) ou com polietilenimina ramificada (BPEI), o que possibilita a interação das enzimas com o suporte. As imobilizações foram feitas por adsorção iônica ou por ligação covalente após a ativação das NPM com glutaraldeído. A carga proteica oferecida e o tempo de imobilização foram estudados. A TLL imobilizada em NPM@BPEI teve atividade hidrolítica 7 vezes maior quando ligada ao suporte por troca iônica do que quando imobilizada por ligações covalentes. Já no caso das NPM@APTES, ambos os derivados apresentaram valores de atividade próximos a 140 U/g de suporte.

1. INTRODUÇÃO

A fim de reduzir o uso de catalisadores químicos tóxicos, que são os principais mediadores de reações industriais, busca-se desenvolver métodos eficazes para utilizar as enzimas como catalisadores "verdes". Enzimas são catalisadores de origem biológica com um alto potencial em diferentes áreas de aplicação da indústria, devido a sua alta seletividade, especificidade e atividade em condições brandas (BRÍGIDA, 2010). Atualmente, as enzimas vêm alcançando altos níveis de aplicação em diversas áreas como a farmacêutica e química fina, na modificação de alimentos ou na produção de energia (por exemplo, biodiesel e bioetanol) (DOS SANTOS, 2015).

Dentre os grupos de enzimas destacam-se as lipases, devido à gama de reações catalisadas em sistemas orgânicos com baixo teor de água (esterificação, interesterificação, aminólise, lactonização), à alta estabilidade nestes ambientes e à possibilidade de utilização em condições brandas de reação. Essa flexibilidade aliada às diferentes lipases confere a essas enzimas um potencial enorme de

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO





XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

aplicações (DOS SANTOS et al., 2015; KORDEL et al., 1991; SOUZA, 2013). Atualmente, as lipases são enzimas entre as mais utilizadas na biocatálise devido também ao seu baixo custo, à sua grande disponibilidade, à sua ampla especificidade acoplada em certos casos, a uma alta seletividade enantiométrica (RUEDA et al., 2015a). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* tem sido bastante utilizada em estudos científicos graças à sua ampla utilização em diferentes reações, como hidrólise de ésteres e transesterificações (DOS SANTOS et al., 2015; GARCIA-GALAN et al., 2014; MENDES et al., 2011; RUEDA et al., 2015a), além de apresentarem uma alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (entre 7 e 10), e possuir um potencial de uso na indústria de detergentes e farmacêutica (BRÍGIDA, 2010).

A lipase de TLL apresenta uma grande tampa única, capaz de evitar completamente a interação do centro ativo da enzima com meio (RUEDA et al., 2015b). Devido a esta tampa, métodos de ativação da enzima são necessários para melhorar a sua atividade catalítica, como por exemplo, imobilização da enzima de forma a manter sua tampa aberta constantemente. Esta enzima pode ser imobilizada em diversos suportes de forma a melhorar a sua estabilidade e manter o seu poder catalítico. A imobilização de enzimas também pode ter desvantagens, como: a perda da atividade catalítica, limitações difusionais e a adição de custos ao processo. Logo, o protocolo de imobilização deve ser bem analisado em cada situação, visando aumentar a estabilidade operacional da enzima e reduzir os custos do processo para possibilitar a aplicação industrial do biocatalisador (DOS SANTOS, 2015; SOUZA, 2013).

As enzimas podem ser imobilizadas covalentemente ou por interação iônica às nanopartículas superparamagnéticas (NSPM) funcionalizadas (XIE; MA, 2009). Essas nanopartículas podem ser separadas do meio reacional por decantação magnética ou em reatores de leito fluidizado magneticamente estabilizados. NSPM funcionalizadas tornaram-se disponíveis comercialmente na última década graças às várias aplicações biotecnológicas e biomédicas (NETO, 2015). Elas consistem de um óxido de ferro (Fe_3O_4) revestido com, por exemplo, sílica que contém extremidades amina ou carboxílica. Esse revestimento pode ser utilizado para ligar a enzima às NSPM e garantir uma maior estabilidade física a essas nanopartículas (SHELDON; VAN PELT, 2013). O termo superparamagnetismo foi introduzido por Bean e Livingstone em 1959 para descrever o comportamento magnético de partículas magnéticas de dimensões em escala nanométrica (GALVÃO, 2014; NETO, 2015).

Modificações foram realizadas na superfície das nanopartículas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), polietilenimina ramificada (BPEI) para proteger as NSPM e possibilitar a ligação das enzimas ao suporte. O polímero APTES (3-aminopropiltriétoxissilano) se apresenta como um importante agente funcionalizador. Os grupos hidroxiláveis presentes neste composto lhe conferem grande versatilidade e justificam o uso do polímero APTES como um promissor agente de adsorção de nanopartículas magnéticas, haja vista que as mesmas, também dispõem de grupos (-OH) em sua superfície, capazes de se ligar ao polímero através de reação de desidratação em meio ácido. Após o processo de adsorção, as NSPM dispõem de grupos amina funcionalizantes (GALVÃO, 2014).

Polietilenimina ramificada (BPEI) possui uma estrutura ramificada com densidade elevada de

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



grupos amino primários, secundários. Isto permite que este polímero seja utilizado como um estabilizador para formar nanopartículas inorgânicas, tais como NSPM (CAI et al., 2013). A combinação de polímeros que contêm esses grupos funcionais e nanopartículas magnéticas proporciona a obtenção de um adsorvente magnético (LARRAZA et al., 2012). O uso desse polímero altera o comportamento de lipases imobilizadas. O revestimento de BPEI geralmente produz um aumento significativo na atividade enzimática, em alguns casos esse aumento é de até 30 vezes (DOS SANTOS et al., 2014).

A estratégia de imobilização escolhida neste trabalho foi a adsorção física ou ligação covalente da lipase de TLL nos suportes superparamagnéticos: nanopartículas de ferro revestidas com 3-aminopropiltriétoxissilano (@APTES) e nanopartículas de ferro revestidas com polietilenimina ramificada (@BPEI). Este método foi escolhido para que seja possível comparar os diferentes revestimentos e as diferentes formas de imobilização da enzima ao suporte.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Materiais

O extrato comercial da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (15,83 mg/mL) foi obtida a partir da Novozymes (Espanha). Os suportes NPM@APTES e NPM@BPEI foram cedidos pelo grupo de Química de Materiais avançados (GQMat) do Departamento de Físico-Química e Química Analítica da Universidade Federal do Ceará, UFC. O substrato ρ -Nitrofenil Butirato (ρ NPB) foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

2.2 Métodos

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são apresentados como a média destes valores e com desvio padrão (geralmente abaixo de 10%).

Preparação das NSPM: As nanopartículas foram sintetizadas pelo método da co-precipitação, assistida por aquecimento de micro-ondas. Os difratogramas das amostras confirmaram a formação das nanopartículas, que apresentaram estrutura cúbica do tipo espinel inverso e boa cristalinidade. Foram obtidos valores de magnetização remanescente e coercividade igual à zero, sugerindo comportamento superparamagnético (GALVÃO, 2014).

Recobrimento do suporte com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES): A amostra de magnetita sofreu modificação de sua superfície pelo polímero APTES (3-aminopropiltriétoxissilano), utilizando o aquecimento por micro-ondas. Realizou-se uma etapa de ultrassom na adsorção da magnetita, a fim de se estudar a influência dessa técnica na eficiência do processo de adsorção do APTES. Os dados obtidos da análise de Infravermelho (FT-IR), confirmaram a adsorção desse polímero às NSPM (GALVÃO, 2014).

Recobrimento do suporte com polietilenimina ramificada (BPEI): A coprecipitação assistida por



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

NH₄OH e a funcionalização por BPEI foram feitas em uma só etapa. A estrutura das NSPM obtidas após o recobrimento com BPEI foi avaliada por meio de Difração de Raio-X (DRX). A presença de grupos funcionais na superfície das NSPM foi confirmada por FT-IR (NETO, 2015).

Ativação do suporte com glutaraldeído: A ativação das NSPM (0,01g) foi realizada com glutaraldeído em solução de 25% (m/v) na proporção de 2,5 mL de solução por grama de suporte. A mistura foi mantida sob agitação (45 rpm) por 2 horas à temperatura ambiente (25°C). Finalmente o suporte foi lavado com tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0 para remover o excesso de agente ativador, baseado na metodologia utilizada por (SOUZA, 2013). A função do glutaraldeído é reagir com os grupos amins dos revestimentos (APTES e BPEI), formando uma ligação imina e deixando um terminal aldeído para reagir com os resíduos de aminoácidos da enzima (SOUZA, 2013).

Imobilização enzimática: A lipase de TLL solúvel foi imobilizada em NSPM revestidas por APTES e em NSPM revestidas por BPEI. Na imobilização do tipo covalente multipontual, o suporte foi reticulado com glutaraldeído antes de entrar em contato com as enzimas (SOUZA, 2013). Já para as NSPM que não sofreram reticulação por glutaraldeído, as enzimas foram imobilizadas por interação iônica. O processo de imobilização foi realizado pelo contato de 0,01 g de nanopartículas superparamagnéticas com 1,0 mL de solução enzimática em tampão de fosfato de sódio, 5 mM (meio de imobilização por interação iônica) ou 25 mM, pH 7,0. A imobilização ocorreu em reator batelada sob agitação orbital por até 24 h e à 25°C, baseado na metodologia apresentada por (SILVA et al., 2012).

Atividade catalítica da enzima livre e imobilizada: A atividade hidrolítica da lipase de TLL foi medida a partir da hidrólise do ρ -Nitrofenil Butirato (ρ NPB), na concentração de 50 mM. O produto da hidrólise do ρ NPB foi quantificado por um espectrofotômetro com comprimento de onda de 400 nm (RUEDA et al., 2015a). Na determinação da atividade da enzima livre utilizou-se 50 μ L de solução enzimática de concentração conhecida (solução de enzima e tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0), 2,5 mL da solução de tampão fosfato de sódio a pH 7,0 e 25 mM à 25°C e 50 μ L do substrato. Observou-se a quantidade de produto formado em 90 segundos segundo a metodologia descrita por (RIOS, 2013). Na determinação da atividade da lipase imobilizada, utilizou-se 0,5 mL de ρ NPB em contato com 10 mg do derivado em 25,5 mL de solução tampão fosfato de sódio pH 7,0, 25 mM. O sistema foi mantido sob agitação mecânica durante pelo menos 15 minutos de acordo com a metodologia descrita por (RIOS, 2013), com modificações. Realizou-se medidas pontuais do aumento da absorvância da solução durante o tempo de reação, de forma regular. Os cálculos de atividade da enzima livre e imobilizada foram realizados de acordo com (BRÍGIDA, 2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Caracterizações das NSPM

Após terem sido sintetizadas, as nanopartículas superparamagnéticas foram avaliadas pelo método Infravermelho (FT-IR) e os resultados são mostrados nas Figuras 1 e 2.

NSPM revestidas com APTES: A análise de Infravermelho foi realizada para o processo de

PROMOÇÃO

REALIZAÇÃO

ORGANIZAÇÃO



adsorção do polímero APTES, com e sem o auxílio do ultrassom (FIGURA 1). A confirmação da adsorção do polímero, deve-se às bandas em 1113, 1048 e 989 cm^{-1} , representando as ligações referentes a estiramento Si-OH e Si-O-Si, respectivamente (FIGURA 1-b). A banda em 1625 cm^{-1} , pode ser atribuída ao estiramento e vibração dos grupos N-H livres. Banda de estiramento C-H pode também aparecer em 2930 e 2862 cm^{-1} (GALVÃO, 2014).

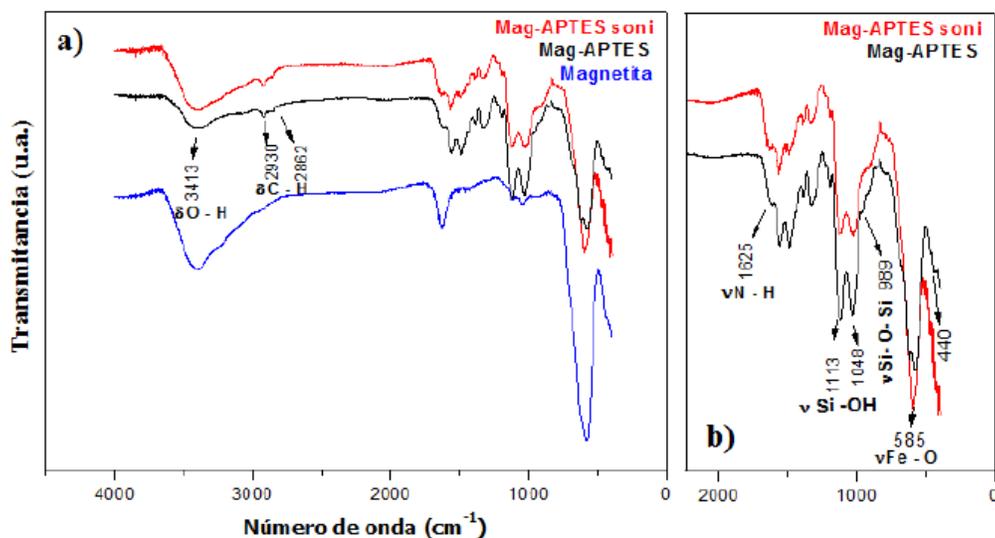


Figura 1 - Espectro infravermelho das NSPM@APTES. Magnetita adsorvida com APTES com auxílio do ultrassom (Mag-APTES soni). Magnetita adsorvida com APTES sem ultrassom (Mag-APTES) (GALVÃO, 2014).

NSPM revestidas com BPEI: A partir da análise FT-IR é possível afirmar que a superfície das NSPM está funcionalizada com a polietilenimina ramificada (FIGURA 2). Uma vez que no espectro da amostra Fe_3O_4 @BPEI apresenta modos vibracionais relativos a Fe_3O_4 e a BPEI livres (NETO, 2015). Os grupos funcionais expressos na análise de infravermelho são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Grupos funcionais expressos na análise de FT-IR (NETO, 2015).

Bandas (cm^{-1})	Grupos funcionais
587	Estiramento Fe-O da magnetita
1106	Estiramento C-N da BPEI
1456	Deformação angular dos grupos -NH ₂ (aminas primárias da BPEI)
1615	Deformação angular dos grupos -NH- (aminas secundárias) da BPEI
3419	Estiramento N-H da BPEI

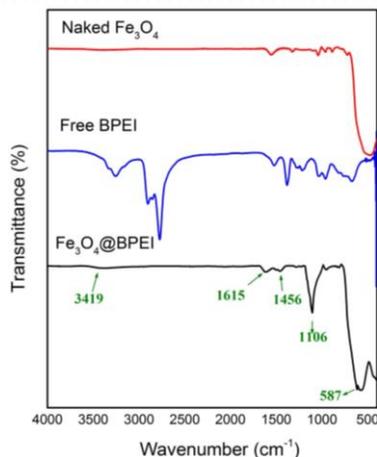


Figura 2 - Análise de infravermelho das NSPM revestidas por BPEI (NETO, 2015).

3.2 Comparações entre os revestimentos e tipos de imobilização

Para esta análise, utilizaram-se os resultados obtidos nos ensaios de carga máxima e de atividade do derivado. Compararam-se tanto os tipos de suporte estudados (NSPM@APTES e NSPM@BPEI), quanto o tipo de imobilização (por ligação covalente ou por adsorção iônica).

Carga máxima: De modo geral, o suporte NSPM@BPEI retém uma maior carga enzimática por dispor de uma superfície ramificada (aminas primárias, secundárias e terciárias), que aumenta a interação enzima – suporte (TABELA 2). A ativação dos suportes com glutaraldeído cria terminais aldeídos que reagem com os resíduos de aminoácidos da enzima, formando ligações covalentes. Essa ativação aumenta a superfície de contato das NSPM recobertas com polímeros (APTES ou BPEI), o que aumenta a retenção de proteínas no suporte. As lipases geralmente apresentam uma ativação interfacial, ou seja, essas enzimas possuem uma tampa verdadeira que pode se abrir para o meio reacional de acordo com as diferentes formas de imobilização (MANOEL et al., 2015a). Assim sendo, a carga imobilizada não garante uma boa atividade catalítica do biocatalisador, ou seja, caso a forma de imobilização desfavoreça a abertura da tampa verdadeira, o substrato não terá acesso ao sítio ativo da enzima imobilizada.

Tabela 2 - Carga máxima retida por cada derivado de acordo com o tipo de imobilização

Tipo de imobilização	Carga máxima imobilizada (mg e/g suporte)	
	NSPM@APTES	NSPM@BPEI
Covalente	0,296 ±0,045	0,314 ±0,051
Iônica	0,081 ±0,01	0,110 ±0,03

Atividade do derivado: Os valores de atividade para a lipase de TLL em NSPM@APTES é aproximadamente o mesmo para os dois tipos de imobilização. Já no caso da enzima em NSPM@BPEI, observa-se uma grande diferença entre os valores encontrados. Como explicado anteriormente, a enzima sofre uma distorção espacial quando imobilizada covalentemente sobre esse suporte devido a seus grupamentos funcionais de superfície (TABELA 3). A lipase de TLL

imobilizada em NSPM@BPEI por interação iônica apresenta a maior atividade catalítica. Isso ocorre graças à presença de aminas primárias, secundárias e terciárias na superfície das NSPM@BPEI, que proporcionam uma maior concentração de enzima na superfície do suporte, melhorando a exposição do biocatalisador ao substrato. Como as interações iônicas caracterizam-se como ligações fracas, elas não prejudicam a estrutura enzimática e, conseqüentemente, não afetam o seu poder catalítico. Pensou-se na possibilidade do suporte catalisar a hidrólise do ρ NPB, levando a um falso positivo. Entretanto, de acordo com (SOUZA, 2013), esta possibilidade foi testada em NSPM modificadas por APTES na ausência de enzima imobilizada, onde não se obteve nenhuma atividade catalítica. Este resultado mostra que as atividades catalíticas provenientes dos biocatalisadores com enzima imobilizada provêm apenas do sítio catalítico enzimático e não do metal presente nas nanopartículas. Observa-se também que apesar da imobilização por adsorção iônica reter uma menor carga enzimática, ela apresenta atividade catalítica maior ou igual à obtida pela imobilização por ligação covalente, para ambos os suportes. Isso ocorre graças à ativação interfacial, que depende da forma de imobilização, como explicado anteriormente. Logo, pode-se concluir que a imobilização por adsorção iônica favoreceu a abertura da tampa verdadeira, melhorando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima imobilizada (MANOEL et al., 2015b).

Tabela 3 - Atividade dos derivados de acordo com o tipo de imobilização

Tipo de imobilização	Atividade do derivado (U/g)	
	NSPM@APTES	NSPM@BPEI
Covalente	140,0 \pm 29,3	27,8 \pm 2,3
Iônica	135,5 \pm 5,8	195,5 \pm 19,9

4. CONCLUSÃO

A modificação das nanopartículas superparamagnéticas de ferro por polímeros (APTES e BPEI) garantiu a proteção das NSPM e uma melhor interação entre o suporte e a enzima. Esses revestimentos também permitiram a interação das NSPM com os grupos aldeídos presentes no glutaraldeído.

Altas cargas enzimáticas e longos períodos de imobilização prejudicaram a atividade do derivado devido a formação de multicamadas. A ativação por glutaraldeído promoveu uma eficiente imobilização da lipase de TLL em nanopartículas tratadas por APTES, gerando um biocatalisador mais estável e com elevada atividade catalítica.

A superfície ramificada das NSPM@BPEI tanto favorece a imobilização por interação iônica, quanto prejudica a atividade catalítica da enzima imobilizada por ligação covalente, devido aos grupos aminas primárias, secundárias e terciárias presentes. Essas ramificações proporcionam uma maior concentração de enzima na superfície do suporte, melhorando a exposição do biocatalisador ao substrato quando a enzima é imobilizada por ligação iônica. As imobilizações covalentes causam inativação da enzima por deformação da estrutura da proteína.



XXI Congresso Brasileiro
de Engenharia Química

Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro



XVI Encontro Brasileiro sobre o
Ensino de Engenharia Química
Fortaleza/CE
25 a 29 de setembro

5. REFERÊNCIAS

- BRÍGIDA, A. I. S. Imobilização de Lipases utilizando fibra da casca de coco verde como Suporte para Aplicações Industriais. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.
- CAI, H. et al. Facile hydrothermal synthesis and surface functionalization of polyethyleneimine-coated iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *ACS applied materials & interfaces*, v. 5, n. 5, p. 1722–31, 2013.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Improving the catalytic properties of immobilized Lecitase via physical coating with ionic polymers. *Enzyme and microbial technology*, v. 60, p. 1–8, 2014.
- DOS SANTOS, J. C. S. OTIMIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES: DESENVOLVIMENTO DE ESTRATÉGIAS PARA MODULAÇÃO DE PROPRIEDADES DE ENZIMAS POR TÉCNICAS FÍSICAS E QUÍMICAS. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2015.
- DOS SANTOS, J. C. S. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. *Process Biochemistry*, v. 5, n. 45, p. in press, 2015.
- GALVÃO, W. DOS S. OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS DE NiFe₂O₄ POR SÍNTESE HIDROTÉRMICA ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2014.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. *Molecules*, v. 19, n. 6, p. 7629–7645, 2014.
- KORDEL, M. et al. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of bacteriology*, v. 173, n. 15, p. 4836–4841, 1991.
- LARRAZA, I. et al. Hybrid materials: Magnetite-Polyethylenimine-Montmorillonite, as magnetic adsorbents for Cr(VI) water treatment. *J Colloid Interface Sci*, v. 385, n. 1, p. 24–33, 2012.
- MANOEL, E. A. et al. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. *Process Biochemistry*, v. 50, n. 10, p. 1557–1564, 2015a.
- MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 71, p. 53–57, 2015b.
- MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. *Química Nova*, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.
- NETO, D. M. A. Ferrofluids obtained by fast sonochemistry approach. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2015.
- RIOS, N. S. Avaliação de suportes nanoestruturados para a imobilização da Lipase de *Yarrowia lipolytica* visando a produção de biodiesel. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.
- RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. *Catalysis Today*, n. In press, p. 10.1016/j.cattod.2015.05.027, 2015a.
- RUEDA, N. et al. Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. *RSC Advances*, v. 5, n. 68, p. 55588–55594, 2015b.
- SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, v. 60, p. 16–24, 2012.
- SOUZA, M. C. M. DE. IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE DE CANDIDA ANTARCTICA DO TIPO B EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS VISANDO A APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES. [s.l.] Universidade Federal do Ceará, 2013.
- XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalys for biodiesel production. *Energy & Fuels*, v. 23, n. 17, p. 1353–1374, 2009.