



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**MARCELA YARA VASCONCELOS DE FARIAS**

**IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPATICULAS MAGNÉTICAS VISANDO A  
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES**

**FORTALEZA-CE  
2017**

**MARCELA YARA VASCONCELOS DE FARIAS**

**IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPATICULAS MAGNÉTICAS VISANDO A  
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES**

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves

**FORTALEZA-CE  
2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

F238i Farias, Marcela Yara Vasconcelos de.  
Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas visando aplicação na produção de ésteres / Marcela Yara Vasconcelos de Farias. – 2017.  
37 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2017.  
Orientação: Profa. Luciana Rocha Barros Gonçalves.

1. Lipase. 2. Nanopartículas magnéticas. 3. Imobilização. I. Título.

CDD 660

---

MARCELA YARA VASCONCELOS DE FARIAS

IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPATICULAS MAGNÉTICAS VISANDO A  
APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE ÉSTERES

Monografia do Trabalho Final do Curso  
de Engenharia Química do Centro de  
Tecnologia da Universidade Federal do  
Ceará, parte dos requisitos para obtenção  
do grau de Engenheiro Químico.

Aprovada em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Luciana Rocha Barros Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Rílvia Saraiva de Santiago Aguiar  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Msc. Nathalia Saraiva Rios  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

À memória das minhas amadas avós Maria do Socorro e Rita.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradeço primeiramente a Deus que foi sustento durante os dias mais difíceis.

À minha família: Farias, Aline, Laura e Mario que confiaram na minha capacidade e não me deixaram desistir.

Ao meu namorado Claudio Arthur que foi um presente de Deus e soube me apoiar em uma fase muito difícil, por todo o companheirismo e amor dedicados a mim.

À minha orientadora Luciana Rocha Barros Gonçalves que me acolheu no laboratório desde o primeiro ano da minha faculdade e me fez crescer como pesquisadora e profissional e por ser um exemplo para mim e para todos.

Às minhas melhores amigas: Ivna, Ewerlane e Luana por toda a paciência e compreensão, elas que me acompanham desde o colégio e são as pessoas com quem compartilhei os melhores momentos.

Aos meus amigos do intercâmbio: Fernanda, Patrícia, Mariana, Renata, Isis, Leonardo, Gregório, Rebeca, Lara, Maria Helena, José, Tatyane, Natália e Bruna, por viverem comigo o momento mais importante da minha vida.

Às minhas fiéis amigas da faculdade: Marcela, Mariana, Ariane e Sâmia, por toda a paciência, dedicação e companheirismo, cujo apoio foi fundamental para que eu pudesse alcançar os meus objetivos.

## RESUMO

---

Dentro do contexto da procura por um desenvolvimento sustentável o uso de catalisadores químicos é um problema a ser analisado. Uma proposta relevante é o emprego de biocatalisadores, pois estes são altamente seletivos e conseqüentemente as reações indesejadas são reduzidas. As lipases do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) são enzimas que por natureza hidrolisam triglicerídeos, mas em meios com baixo teor de água são capazes de catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação. Entretanto, a utilização de enzimas como catalisadores homogêneos é limitada devido à dificuldade do processo de separação. Essa questão pode ser solucionada pelo uso de suportes para a imobilização enzimática que mantenham suas características catalíticas. No presente trabalho, avaliaram-se nanopartículas magnéticas de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (NPM) como suporte para a imobilização de CALB. O biocatalisador foi empregado na catálise da reação de esterificação para a produção do butirato de etila. Os ésteres de ácidos graxos de cadeia curta são amplamente utilizados em alimentos, bebidas, indústrias cosmética e farmacêutica com componentes de sabor e fragrância. Esses aromas são comumente extraídos da natureza, porém devido a questões ambientais a disponibilidade desse produto pode ser comprometida. As nanopartículas foram obtidas pela técnica de co-precipitação. A superfície das nanopartículas foi modificada com aminopropiltriétoxissilano e glutaraldeído. No processo de imobilização a influência da carga enzimática ( $50\text{-}200 \text{ UpNPB.g}^{-1}$ ) e a proporção APTES/Magnetita (1:1, 1:3, 1:4 em massa de APTES) e a reutilização do biocatalisador foram avaliadas. As condições ótimas de imobilização foram: Carga enzimática ( $200 \text{ UpNPB.g}^{-1}$ ) e proporção de 1:3 APTS/Magnetita. A imobilização foi realizada na presença de 100 mM de tampão bicarbonato de sódio, pH 10, 25 °C. As melhores condições para a produção do éster foram 25 °C, heptano como solvente, razão molar de 1:1, 0,4 mol/L de substratos, 150 rpm e 8 h reação. A conversão máxima de butirato de etila (80%) foi obtida após 8 horas de reação a 25 °C utilizando CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas. Os ciclos de reação consecutivos mostraram que após 11 ciclos, 45% de conversão foi mantida. Os resultados obtidos indicam um grande potencial para o uso do biocatalisador na síntese de ésteres de alto valor agregado

**Palavras-chave:** *Lipase, Nanopartículas magnéticas, Imobilização, Ésteres.*

## ABSTRACT

---

In the context of the pursuit of sustainable development the use of chemical catalysts is a problem to be analyzed, a relevant proposal is the use of biocatalysts, since these are highly selective and consequently the unwanted reactions are reduced. *Candida antarctica* type B lipases (CALB) are enzymes that naturally hydrolyze triglycerides, but in medium with low water content they are capable of catalyzing reactions of esterification, interesterification and transesterification. However, the use of enzymes as homogeneous catalysts is limited due to the difficulty of the separation process. This issue can be solved using supports for enzymatic immobilization that maintain their catalytic characteristics. In the present work, iron magnetic nanoparticles ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (NPM) were evaluated as a support for the immobilization of CALB. The biocatalyst was used in the catalysis of the esterification reaction to produce ethyl butyrate. Esters of short chain fatty acids are widely used in food, beverage, cosmetic and pharmaceutical industries with components of flavor and fragrance. These aromas are commonly extracted from nature, but due to environmental issues the availability of this product may be compromised. The nanoparticles were obtained by the co-precipitation technique. The surface of the nanoparticles was modified with aminopropyltriethoxysilane and glutaraldehyde. In the process of Immobilization, the influence of the enzymatic charge (50-200 UpNPB.g<sup>-1</sup>) and the APTES/Magnetite ratio (1: 1, 1: 3, 1:4 by mass of APTS) and reuse of the biocatalyst were evaluated. The optimum conditions of immobilization were: The enzymatic loading (200 UpNPB.g<sup>-1</sup>) and ratio of 1: 3 APTES / Magnetite. Immobilization was performed in the presence of 100 mM sodium bicarbonate buffer, pH 10, 25°C. The best conditions for ester production were 25°C, heptane as solvent, molar ratio of 1: 1, 0.4 mol / L of substrates, 150 rpm and 8 h reaction. Maximum conversion of ethyl butyrate (80%) was obtained after 8 hours of reaction at 25 ° C using CALB immobilized on magnetic nanoparticles. The consecutive reaction cycles showed that after 11 cycles, 45% conversion was maintained. The results indicate a great potential for the use of the biocatalyst in the synthesis of high added value esters

**Key words:** *Lipase, Magnetic nanoparticles, Immobilization, Esters.*

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1. Processo de formação da ligação peptídica das proteínas.....	16
Figura 2. Estruturas das Proteínas .....	17
Figura 3 Sítio Ativo da Enzima Candida Antactica do tipo B.....	19
Figura 4. (A) Nanopartícula magnética (MNPs) funcionalizadas com 3-aminopropyl trietoxissilano (APTES). (B) Reticulação de glutaraldeído (GLU) de MNPs. (C) Candida Lipase B da Antártica (CALB) Imobilização em MNP.....	21
Figura 5 Mecanismo da reação de estereificação catalisada por enzimas .....	24
Figura 6 Atividade do derivado em proporções de carga enzimática oferecida.....	28
Figura 7 : Atividade do derivado em proporções de mag/APTES .....	29
Figura 8 Estabilidade operacional de CALB-NPM (■) em síntese de butirato de etila. ....	31

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas e suas aplicações biotecnológicas .....	22
Tabela 2 Dados de atividade da enzima imobilizada com a carga máxima oferecida. ....	28
Tabela 3. Parâmetros de imobilização para as diferentes proporções mag/APTES em massa de APTES (1:1, 1:3 e 1:4) .....	29
Tabela 4 Dados de índice de acidez e conversão do biodiesel produzido da reação de ácido oleico com etanol catalisado pelo sistema mag/APTES/CALB em concentrações diferentes de mag/APTES .....	30

## SUMÁRIO

---

LISTA DE SIGLAS .....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Contextualização.....	13
1.2. Justificativa .....	13
1.3. Objetivo geral .....	15
1.4 Objetivos específicos .....	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1. Função e Estrutura das Proteínas .....	16
2.2. Enzimas.....	17
2.3. Lipases .....	18
2.4. Imobilização.....	19
2.5 Nanopartículas magnéticas de ferro.....	20
2.6. Produção de nanopartículas magnéticas de ferro Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	20
2.7. Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas de ferro .....	22
2.8. Ésteres .....	23
3. MATERIAIS E METÓDOS.....	25
3.1. Materiais .....	25
3.2 Síntese de Nanopartículas .....	25
3.3. Imobilização de lipase C. antártica tipo B em nano partículas magnéticas:.....	25
3.3.1. Tratamento do suporte com aminopropiltrietoxisilano (APTES).....	25
3.3.2. Ativação do suporte com Glutaraldeído.....	26
3.3.3. Imobilização Enzimática.....	26
3.4. Síntese de oleato de etila.....	26
3.5. Síntese do Butirato de Etila .....	26
3.6. Reutilização do biocatalisador .....	27
3.7. Parâmetros de imobilização .....	27
3.7.1. Rendimento de imobilização.....	27
3.7.2 Atividade recuperada (Atr).....	27
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
4.1. Efeitos da carga enzimática .....	28

4.2. Efeitos da concentração em massa de APTES no núcleo magnético .....	29
4.3. Reações de esterificação do ácido oleico para produção de biodiesel.....	30
4.4. Produção e Estabilidade operacional do Butirato de Etila.....	31
CONCLUSÃO.....	33
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA .....	34

## LISTA DE SIGLAS

---

APTES  $\gamma$  -aminopropiltriétoxissilano

CALB Lipase de *Candida antarctica* do tipo B

DRX Difração de raios-X

GQMAT Grupo de química de materiais avançados

NPM Nanopartículas magnéticas de ferro

*p*NPB *p*-Nitrophenil Butirato

GLU Glutaraldeído

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Contextualização

A indústria química está pouco a pouco se direcionando para processos mais ecológicos e preocupados com o meio ambiente, nessa perspectiva, o emprego de catalisadores químicos é um dos principais obstáculos a serem contornados uma vez que essas substâncias mediam a maioria das reações na indústria. Deste modo, busca-se catalisadores mais eficientes e produzidos a partir de fontes renováveis, como as enzimas que são biocatalisadores altamente seletivos tendo como resultado a redução de reações indesejáveis. (SOUZA, M.C. 2012)

Apesar dos grandes benefícios da utilização dos biocatalisadores, algumas desvantagens ainda persistem. Estas desvantagens estão associadas à estabilidade, pureza da enzima, disponibilidade e na impossibilidade de sua reutilização na forma solúvel (livre). Uma solução para contornar estes inconvenientes tem sido a imobilização destas enzimas. As lipases têm sido imobilizadas através de vários métodos, nomeadamente de adsorção, cross-linking, adsorção seguida de cross-linking, ligação covalente multipontual e aprisionamento físico. (ITABAIANA. et al., 2012)

## 1.2. Justificativa

A utilização de suportes sólidos para a imobilização enzimática é importante devido à possibilidade de reutilização do biocatalisador e à contribuição para a estabilidade da enzima. O uso de nanopartículas magnéticas como suporte sólido atribui ao biocatalisador um dos requisitos essenciais de fácil recuperação por simples aplicação de um campo magnético externo, reduzindo os custos de energia e tempo das etapas de centrifugação. Além do que nanomateriais apresentam uma alta relação superfície/volume facilitando assim a transferência de massa (PEREIRA *et al.* 2015).

As lipases são a classe de enzimas mais aplicadas na biotecnologia as três razões para que isso ocorra são: as preparações industriais de muitas lipases estavam disponíveis por conta das suas aplicações em enzimologia industrial precoce; eles realizam reações frequentemente em meios

heterogêneos mostrando o fenômeno de ativação interfacial; eles têm grande especificidades de substrato, além das lipases de hidrólise também podem catalisar esterificação, interesterificação e transesterificação. (POLAINA *et al.* 2016)

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são hidrolases que catalisam a hidrólise de triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres e também são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. Essas enzimas são utilizadas para catalisar reações em indústrias de alimentos, de produtos farmacêuticos, de cosméticos, de químicos finos, de detergentes, de fabricação de papel e também no tratamento de águas residuais (PEREIRA *et al.* 2015).

Como já mencionado as lipases são enzimas largamente utilizadas na biocatálise. Uma das suas principais aplicações são as reações de esterificação para produção de ésteres úteis. Os ácidos graxos de cadeia curta têm um papel significativo nas indústrias de alimentos e bebidas, pois esses componentes são responsáveis pelo aroma e sabor. Dentre eles pode-se destacar o butirato de etila que é um constituinte de sabores de algumas frutas importantes como morango, abacaxi e maracujá. (RODRIGUEZ-NOGALES *et al.*, 2005). Esse éster pode ser obtido de recursos naturais, porém devido a questões ambientais a sua disponibilidade na natureza pode ser comprometida. O butirato de etila é atualmente produzido por rotas químicas que utilizam catalisadores químicos poluentes, assim após a produção do aroma é necessário que o produto passe por etapas de pós-tratamento. As lipases também são empregadas na produção de ésteres ácidos graxos como o oleato de etila, um éster utilizado como biodiesel, aditivo para diesel combustível e na indústria cosmética e alimentícia (MARCHETTI; ERRAZU, 2008).

Portanto, esse trabalho trata do desenvolvimento de melhores condições para o uso eficiente de biocatalisadores enzimáticos suportados em nanopartículas magnéticas para a obtenção de produtos de interesse da indústria alimentícia e de bebidas. Os principais aspectos analisados são o estudo da carga de enzima oferecida, da concentração APTES/Magnetita e também é analisada a viabilidade de reutilização do biocatalizador.

### **1.3. Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho é o estudo das condições adequadas para o uso eficiente de biocatalisadores enzimáticos imobilizados em nanopartículas magnéticas para a obtenção de produtos de interesse da indústria.

### **1.4 Objetivos específicos**

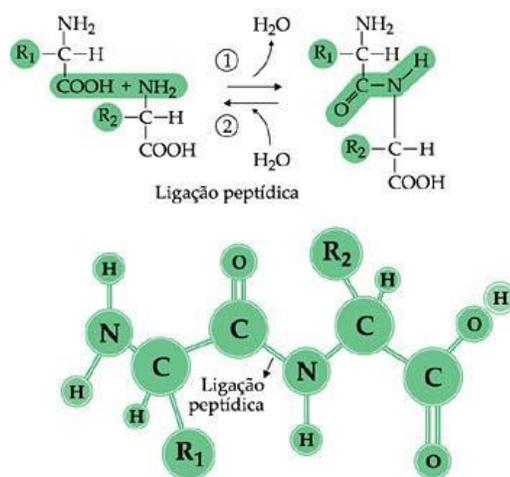
- Estudar a modificação da superfície das nanopartículas magnéticas de ferro com aminopropiltriétoxissilano (APTES) para posterior imobilização de CALB;
- Imobilizar a CALB em nanopartículas magnéticas por imobilização covalente.
- Avaliar a síntese de ésteres oleato de etila (biodiesel), butirato de etila utilizando enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas como catalisadores;

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Função e Estrutura das Proteínas

As Proteínas são macromoléculas encontradas na natureza que possuem diferentes formas e funções. Essas biomoléculas são formadas a partir de longas cadeias de aminoácidos que se unem por meio de ligações peptídicas. Os aminoácidos são as unidades estruturais fundamentais das proteínas. Essas unidades são formadas de uma carboxila, um grupamento amina, um átomo de hidrogênio e um radical que difere cada aminoácido. As ligações peptídicas, apresentadas na Figura 1, são formadas quando o grupamento amina de um aminoácido se liga à carboxila do outro aminoácido liberando uma molécula de água. (BERG et al., 2015)

Figura 1. Processo de formação da ligação peptídica das proteínas.

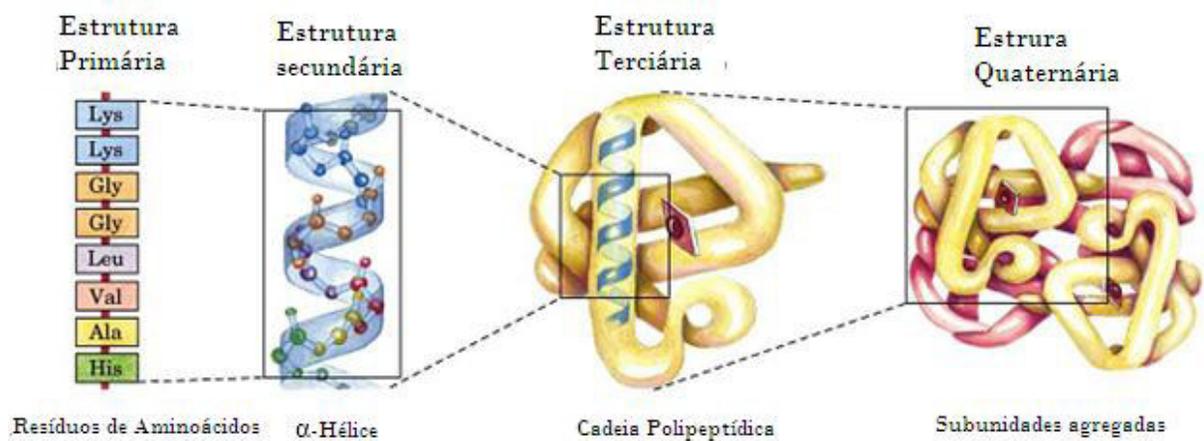


Fonte: MARQUES, 2014

É possível encontrar na natureza um total de 20 aminoácidos que possuem características físicas e químicas particulares. Essas propriedades específicas de cada aminoácido são fundamentais para que as proteínas apresentem uma diversidade de funções nos seres vivos. As proteínas apresentam quatro estruturas principais: primária (a sequência de aminoácidos de um polipéptido), secundária, (dobragem de um polipéptido em hélices  $\alpha$ , folhas  $\beta$ ), terciária (a organização geral de estruturas secundárias de um polipéptido) e quaternária (a associação de polipéptidos múltiplos). As estruturas das proteínas são representadas na Figura 2 (JEZ, 2017).

A estrutura terciária é gerada devido a séries de cadeias peptídicas que se enovelam em domínios com estruturas tridimensionais específicas. Estes domínios funcionam como módulos para a formação de grande agregados. Assim, da mesma forma que a na engenharia os sistemas são formados a partir de partes menores para que possam ser utilizadas em outras situações e outros sistemas, na natureza as macromoléculas são constituídas por pequenos módulos que permitem que elas reutilizem ao invés de reinventarem (MOORE et al., 2008).

Figura 2. Estruturas das Proteínas



Fonte: RIBEIRO, 2011

## 2.2. Enzimas

As enzimas são uma importante classe de proteínas que operam como facilitadores ou catalisadores de reações bioquímicas relacionadas à função de organismos vivos. As enzimas funcionam como máquinas moleculares altamente específicas capazes de quebrar, formar ou modificar moléculas.

Esses biocatalisadores vêm sendo utilizados desde os tempos pré-históricos, porém o seu mecanismo só começou a ser estudados em 1877, quando Moritz Traube propôs que "os materiais semelhantes a proteínas catalisassem a fermentação e outras reações químicas...". Além de serem fundamentais para as funções vitais, as enzimas são amplamente utilizadas na catálise de reações na Indústria. (POLAINA et al, 2016). As reações enzimáticas ocorrem, em sua maioria em condições amenas de pH e temperatura e com velocidade até 1012 vezes maiores do que as reações

não catalisadas (VOET; VOET, 1995; SOUZA, 2013; JEGANNATHAN, K.R. & NIELSEN, P.H, 2013).

A capacidade de catalisar reações das enzimas está muito associada a interação da enzima e do substrato. As enzimas apresentam um sitio ativo que é uma parte específica onde a catalise ocorre. O substrato liga-se ao sitio ativo da enzima resultando no complexo enzima-substrato. As ligações envolvidas no complexo são bem específicas, portanto dependem do arranjo bem definidos na região ativa. (PALMER, 1995)

Os processos enzimáticos têm ganhado grande visibilidade na Indústria, pois têm ação rápida, são altamente específicos e podem economizar matéria prima, produtos químicos e energia quando comparados aos outros processos químicos. Atualmente, existem por volta de 5500 enzimas conhecidas, classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam (hidrolases, lipases, transferases, liases, isomerases e ligases). Os nomes de enzimas específicas referem-se à substância em que atuam. Uma enzima que atua sobre proteína, por exemplo, é conhecida como protease. (JEGANNATHAN, K.R. & NIELSEN, P.H, 2013)

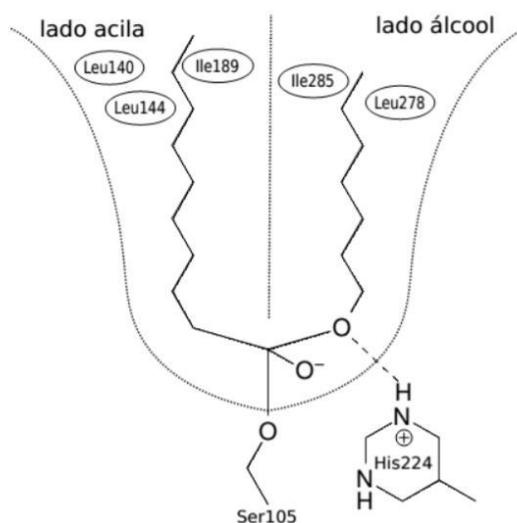
### **2.3. Lipases**

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são hidrolases que catalisam triglicerídeos em glicerol e ácidos graxos livres. Essas enzimas também são capazes de catalisar reações de hidrólise e transesterificação de ésteres e síntese de ésteres com propriedades enantioselectivas (PEREIRA et al. 2015). As lipases são o terceiro maior grupo enzimático em termos de preço de mercado. Esse grupo enzimático é largamente utilizado com aditivo em alimento, cosméticos, processamento do couro, detergentes, produtos químicos finos, tratamento de águas residuais fabricação de papel.

Essas enzimas são produzidas por diversos microrganismos, plantas e mamíferos, porém devido à grande variedade de atividades catalíticas, à facilidade de manipulação genética e ao rápido crescimento dos microrganismos, as enzimas microbianas são mais utilizadas do que as enzimas provenientes de plantas ou animais. Além disso, as enzimas provenientes de microrganismos são mais estáveis e tem uma produção mais segura. (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

Dentre as diversas cepas produtoras de lipases, destacam-se as que são produzidas por *Candida sp*, uma vez que são enzimas bem definidas para propósito de biocatálise, especialmente lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (MARIA et al., 2005). CALB faz parte da família das  $\alpha/\beta$  hidrolases com uma tríade catalítica conservada que consiste em Ser, His, Asp/Glu (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). O sítio ativo desse grupo é composto por uma cavidade para ligações acila e outra para ligações com álcoois, como pode ser observado na figura 3. O diferencial dessa lipase para a maioria é que esse grupo apresenta um impedimento menor na entrada da cavidade catalítica, portanto facilita a entrada do substrato e saída do produto (UPPENBERG et al., 1994; SOUSA, M.C., 2012).

Figura 3 Sítio Ativo da Enzima *Candida Antactica* do tipo B



Fonte: SOUZA, 2013

## 2.4. Imobilização

Imobilização enzimática é uma das técnicas mais importantes na aplicação de catálise enzimática para reações sintéticas em solventes orgânicos. Existem muitas vantagens na utilização das enzimas imobilizadas, pois na grande maioria as enzimas são insolúveis em solventes orgânicos. Dentre as vantagens de usar o catalisador heterogêneo podemos ressaltar a reutilização do catalisador sem perdas significativas. Além disso, as lipases podem ser imobilizadas por um simples processo de adsorção o que não requer muita energia e não afeta as características das

enzimas. Este processo gera produtos muito estáveis e os suportes escolhidos podem prolongar a meia-vida das enzimas imobilizadas (PEREIRA et al. 2015).

As enzimas em sua forma livre possuem baixa estabilidade em relação à temperatura e ao pH, Além de que os custos desse biocatalisador encorajam o uso de técnicas de imobilização com objetivos de facilitar a separação, recuperação e aumento da atividade (SARNO et al, 2017). As técnicas de imobilização, a natureza do solvente, os tipos de suporte influenciam as propriedades da enzima imobilizadas, assim é de extrema importância que esses parâmetros sejam avaliados de acordo com o uso em determinada reação (IDRIS; BUKHARI, 2011). Diversas metodologias são empregadas na imobilização de lipases tais como: ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento, adsorção e ligação cruzada.

## **2.5 Nanopartículas magnéticas de ferro**

Neste contexto as nanoestruturas aparecem como uma alternativa aos suportes tradicionais. As nanopartículas magnéticas têm ganhado significativa atenção dos pesquisadores devido as fortes propriedades magnéticas, elevada área superficial, baixa toxicidade, maior tolerância com a temperatura e biocompatibilidade com materiais biológicos (YONG et al., 2008; LEI et al., 2009).

Esses nanomateriais magnéticos podem ser encontrados na natureza, como por exemplo, nanopartículas magnéticas de magnetita que são observadas em insetos, bactérias e até animais maiores. A magnetita é um importante minério de ferro que confere as propriedades magnéticas das rochas, muitos desses organismos utilizam esse minério para facilitar a orientação geográfica. A estrutura da magnetita  $Fe_3O_4$  contém ferro com estado de oxidação  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$  com estrutura do tipo espinélio inverso, onde os 08 sítios tetraédricos são preenchidos por  $Fe^{3+}$  e os 16 sítios octaédricos são preenchidos por íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  (CORNELL; SCHWERTMANN, 2003; JUNIOR, 2009; SOUZA, 2013).

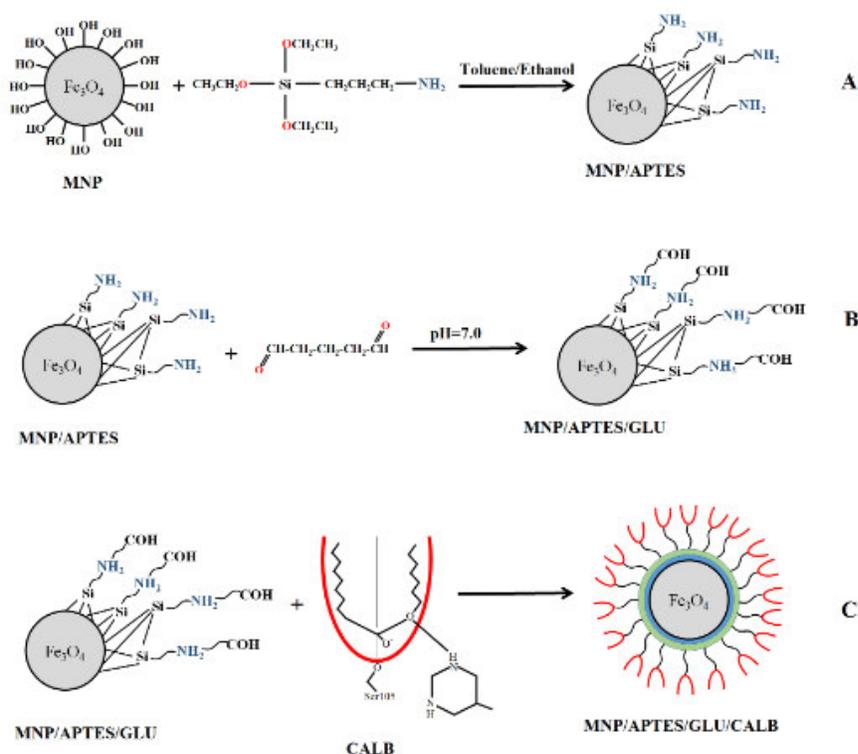
## **2.6. Produção de nanopartículas magnéticas de ferro $Fe_3O_4$**

Nanopartículas podem ser produzidas por diversas metodologias tais como co-precipitação, decomposição térmica, microemulsão, pirólise e liga mecânica. Contudo, pode-se destacar o método de co-precipitação que é uma técnica fácil e conveniente de produzir óxidos de

ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ou  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) a partir de soluções aquosas de sal  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$  pela adição de uma base sob atmosfera inerte à temperatura ambiente ou a temperatura elevada. (ABU-DIEF & ABDEL-FATAH, 2017).

O formato, a dimensão e a composição das nanopartículas magnéticas têm como variáveis o tipo dos sais empregados, a proporção  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ , a temperatura de reação, o pH da solução, a força iônica do meio e a taxa de mistura com a solução da base. (ABU-DIEF & ABDEL-FATAH, 2017). Os grupos hidroxilas existentes sobre a superfície das nanopartículas magnéticas, tais como  $\text{FeOH}$  possibilitam a ligação com alguns grupos funcionais importantes que melhoram a estabilidade térmica e operacional do suporte (FIGURA 4).

Figura 4. (A) Nanopartícula magnética (MNPs) funcionalizadas com 3-aminopropyl trietoxissilano (APTES). (B) Reticulação de glutaraldeído (GLU) de MNPs. (C) Candida Lipase B da Antártica (CALB) Imobilização em MNP.



Fonte: Costa et al., 2013

A funcionalização com 3-aminopropyltriethoxysilane – APTES proporciona um recobrimento de silicato que contribui para estabilizar as nanopartículas contra a oxidação pelo ar. E os grupamentos aminos são importantes para prevenir a agregação das partículas. Glutaraldeído reage com o grupo amino de APTES-MNP formando ligações do tipo imina, assim os grupos

aldeídos ficam livres para reagir com o grupo amino da enzima. (REBELO et al, 2010). Além disso, de acordo com REBELO et al, 2010 as nanopartículas tratadas com glutaraldeído mostram maior capacidade de reutilização.

## 2.7. Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas de ferro

No contexto da nanotecnologia, as nanoestruturas surgem como suportes alternativos para a imobilização enzimática. Propriedades como tamanho reduzido, área de superfície alta, resistência a altas temperaturas, altas interações enzimas-substrato e alta reatividade química atraíram a atenção dos cientistas nos tempos atuais (HU et al., 2009; COSTA et al., 2016). Além do que, devido à propriedade do superparamagnetismo é possível a recuperação do biocatalisador apenas por aplicação de um campo magnético ocasionando baixo estresse mecânico as enzimas.

São relatados na literatura diversos métodos e suportes para imobilização de distintos tipos de enzimas em nanopartículas magnéticas, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas e suas aplicações biotecnológicas

Enzimas	Nanopartículas	Aplicações	Referências
Laccase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - quitosana	Degradação de Clorpirifos	(DAS <i>et al.</i> , 2017)
Lipase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	Produção de Biodiesel	(KARIMI, 2016)
Lipase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Síntese de Aroma de Banana	(SARNO et al, 2017)
Queratinase	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Síntese de queratina	(KONWARH et al., 2009)

Fonte: Próprio Autor

Comumente a superfície das nanopartículas é modificada em busca de facilitar o processo de Imobilização enzimática. Essas nanoestruturas são modificadas com materiais orgânicos (por exemplo, ácido láurico) e inorgânicos (por exemplo, SiO<sub>2</sub>) com o intuito de produzir partículas funcionalizadas (por exemplo, grupo amino) para imobilização enzimática.

Os agentes de acoplamento são comumente utilizados para reticular covalentemente as nanopartículas e enzimas magnéticas modificadas porque os seus grupos podem interagir tanto com os grupos funcionais da nanopartícula magnéticas modificadas como os grupamentos das enzimas. Um exemplo de agente de acoplamento é o glutaraldeído, cujo grupo funcional é o grupo aldeído.

Essa enzima imobilizada é mais estável que a imobilizada por adsorção física sem agentes de acoplamento, o que foi demonstrado por REBELO et al, (2010), onde as lipases funcionalizadas com Gutaraldeído excederam 8 ciclos com a mesma eficiência de conversão (50%) e enantioselectividade (> 99%), enquanto os outros dois métodos colapsaram após o quinto ciclo.

## 2.8. Ésteres

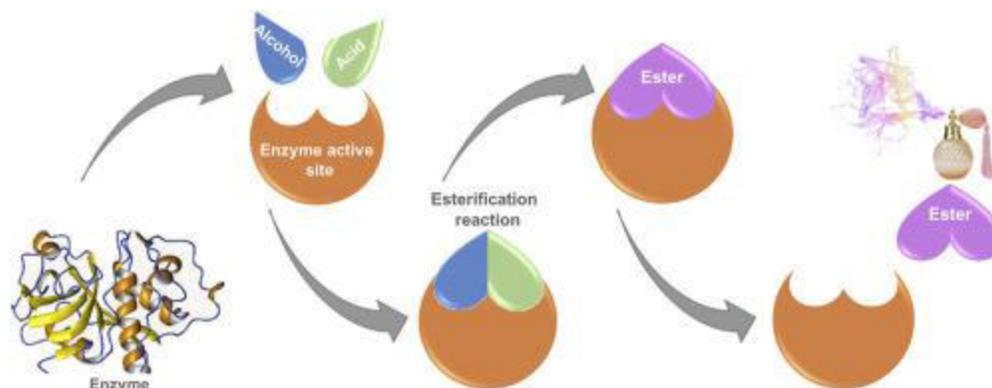
Os ésteres de ácido graxo são de grande interesse industrial, pois são encontrados em diversos produtos como sabores aromas, perfumes, cosméticos, medicamento e também na produção de biocombustíveis. A síntese química de ésteres apresenta muitas desvantagens e impactos ambientais durante a produção e processos de purificação, devido a utilização de produtos químicos perigosos, solventes tóxicos e alta temperatura e pressão. Adicionalmente, a rota de produção química pode tornar bastante onerosa devido à falta de seletividade do substrato e remoção dos subprodutos, longos tempos de reação, possibilidade de corrosão do equipamento e elevado consumo de energia (SOUSA, M.C., 2012; SÁ et al., 2017).

Além do que, devido a possibilidade de vestígios tóxicos perigosos a saúde humana no produto final, os ésteres produzidos por rota química não podem ser denominados naturais. Dentro desse contexto o emprego de enzimas possibilita a obtenção de um melhor produto em condições mais brandas que podem ser denominados (SOUSA, M.C., 2012; SÁ et al., 2017).

Assim, várias lipases foram estudadas e aplicadas para catalisar a reação de esterificação, tais qual: Lipase de *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus*, *Pseudomonas fluorescens* (LIAQUAT & OWUSU, 2000; GÜVENÇ et al, 2002; PANDEY et al, 1999).

Dentre as principais aplicações da lipase podem-se destacar a produção de ésteres de cadeia curta, cujo componentes são amplamente empregados como aromas e sabores nas indústrias de alimentos e bebidas. Por exemplo o butirato de etila e metila, que compõem os aromas de muitas frutas, por exemplo: abacaxi, maracujá, morango e maçã (GROSSO; FERREIRA-DIAS; PIRES-CABRAL, 2012; LIAQUAT; APENTEN, 2008; RODRIGUEZ-NOGALES; ROURA; CONTRERAS, 2005).

Figura 5 Mecanismo da reação de estereificação catalisada por enzimas



Fonte: SÁ et al, 2017

Os ésteres metílicos e etílicos, de ácidos graxos de cadeia longa como os oleatos, palmitatos, ricinoleatos e linolenatos são os compostos principais biodiesel. O biodiesel apresenta diversas vantagens sobre os combustíveis atualmente utilizados, pois é um biocombustível renovável, não- inflamável, biodegradável e não tóxico. (KHOOBBAKHT et al., 2016a, 2016b). O biodiesel é produzido a partir da esterificação de ácidos graxos de cadeia curta e álcoois, geralmente metanol e etanol por possuírem valor mais baixo.

### 3. MATERIAIS E METÓDOS

---

#### 3.1. Materiais

Nanopartículas magnéticas ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) híbridas foram cedidas pelo Grupo de Química de Materiais Avançados (GQMAT), Departamento de Química Analítica e Físico-Química, Universidade Federal do Ceará, UFC. Lipase do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) referida como Lipozyme CALB L® foi obtida da Codexis (Redwood, USA), 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES), solução de glutaraldeído de grau II 25% (m/v), p-nitrophenil butirato (pNPB) and p-nitrophenil (pNP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Os outros reagentes foram obtidos das empresas Synth (São Paulo, Brasil) e Vetec (São Paulo, Brasil).

#### 3.2 Síntese de Nanopartículas

As nanopartículas magnéticas foram produzidas através da metodologia de Barreto et al (2011). Para a co-precipitação, uma solução de sais metálicos contendo  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1: 2) foi diluído em mili-Q de água para formar a estrutura de espinélio inverso ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). A mistura aquosa foi aquecida a  $70^\circ \text{C}$  sob agitação contínua. O precipitado passou por seguidas lavagens com Água mili-Q até o pH final ser obtido na solução residual e uma única lavagem com metanol. As nanopartículas magnéticas foram secas em um dessecador sob vácuo.

#### 3.3. Imobilização de lipase *C. antártica* tipo B em nano partículas magnéticas:

##### 3.3.1. Tratamento do suporte com aminopropiltriethoxissilano (APTES)

A tratamento da magnetita consistiu do uso de 3-aminopropiltriethoxissilano (APTES) foi executado seguindo a metodologia modificada de Can *et al.* (2009). Num balão de fundo redondo, uma suspensão de 100 mg de magnetita foi preparada em uma mistura de etanol e tolueno numa razão 1: 2. Diferentes proporções de magnetita e APTES nas razões (1: 1), (1: 3) e (1: 4) reagiram sob uma solução em atmosfera inerte com agitação contínua durante 24 h até a cor mudar para um sólido castanho. O precipitado obtido foi lavado diversas vezes com etanol até a completa retirada de resíduos e secou-se em um dessecador sob vácuo constante

### **3.3.2. Ativação do suporte com Glutaraldeído**

Em seguida do tratamento com APTES, a ativação dos suportes foi realizada com solução de glutaraldeído 0.6% (v/v) por 2h a 25°C. Depois do suporte ativado, as nanopartículas foram lavadas com tampão bicarbonato-carbonato de sódio, pH 7,0, 100mM para remoção do do agente ativador em excesso.

### **3.3.3. Imobilização Enzimática**

A lipase do tipo B de *Candida antarctica* solúvel foi imobilizada em nanopartículas magnéticas sendo funcionalizada por APTES e ativadas por glutaraldeído 0,6% na concentração de 200,0 UpNPB de enzima por grama de suporte. A imobilização foi realizada em presença do tampão bicarbonato 100mM, pH 7,0 e pH 10(razão m/v de 1/10) a 25 °C e tempo de incubação de 1 h, sob agitação controlada.

### **3.3.4. Medida da atividade enzimática**

A atividade hidrolítica da CALB solúvel e imobilizada (derivado) ( $A_d$ ) foi determinada usando butirato de p-nitrofenol (*p*NPB) como substrato, a pH 7,0 e 25°C, seguindo a metodologia proposta por KORDEL *et al.* 1991.

## **3.4. Síntese de oleato de etila**

A análise de esterificação ocorreu em microtubos plásticos (2,0 mL) contendo 0,6 de ácido oleico e 151 µL de etanol (razão molar 1:1), assim como 0,01 g de biocatalisador CALB-NPM (1,7% de massa reacional). A reação foi realizada em agitação orbital (150 rpm), a 37°C.

## **3.5. Síntese do Butirato de Etila**

A síntese de ésteres por reação de esterificação foi composta de 1 mL de solventes (heptano, como meio reacional, ácido butílico e etanol) na concentração 0.4 mol e razão molar 1:1. O biocatalisador (0,01 g), denominado CALB-NPM foi adicionado a uma atividade específica

(200u.g<sup>-1</sup>). A reação foi conduzida sob agitação orbital a 155 rpm. O índice de acidez foi avaliado pelo método Ca 5-40 AOCS (MOSSOBA *et al.*, 2003).

### 3.6. Reutilização do biocatalisador

A estabilidade operacional foi realizada por reações consecutivas da síntese do éster butirato etila, usando 0,01 g de CALB-NPM. Antes de cada novo ciclo, CALB-NPM foi separada por magnetização e lavada com hexano para remoção de produtos e substratos não reagidos. As reações foram operadas como descrito na seção

### 3.7. Parâmetros de imobilização

#### 3.7.1. Rendimento de imobilização

Após a medida inicial de atividade ( $At_i$ ) e da atividade da enzima final ( $At_f$ ) no sobrenadante e no ensaio em branco, a atividade enzimática remanescente no sobrenadante ( $At_i - At_f$ ) e o rendimento de imobilização (IY) pode ser calculada, utilizando a equação 1 (KORDEL *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2012).

$$IY_{imob}(\%) = \frac{At_i - At_f}{At_i} \times 100 \quad (1)$$

#### 3.7.2 Atividade recuperada ( $At_r$ )

A atividade teórica ( $At_t$ ) imobilizada no suporte pode ser calculada utilizando a quantidade de enzima oferecida por grama de suporte ( $At_{off}$  - U / g de suporte) e o rendimento de imobilização, equação 2. Após a medição da atividade da enzima imobilizada ( $At_d$  - U / g de suporte), a atividade recuperada (MENDES *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2012) foi calculada utilizando a equação 3.

$$At_t = IY \times At_{off} \quad (2)$$

$$At_r = \frac{At_d}{At_t} \times 100 \quad (3)$$

## 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

### 4.1. Efeitos da carga enzimática

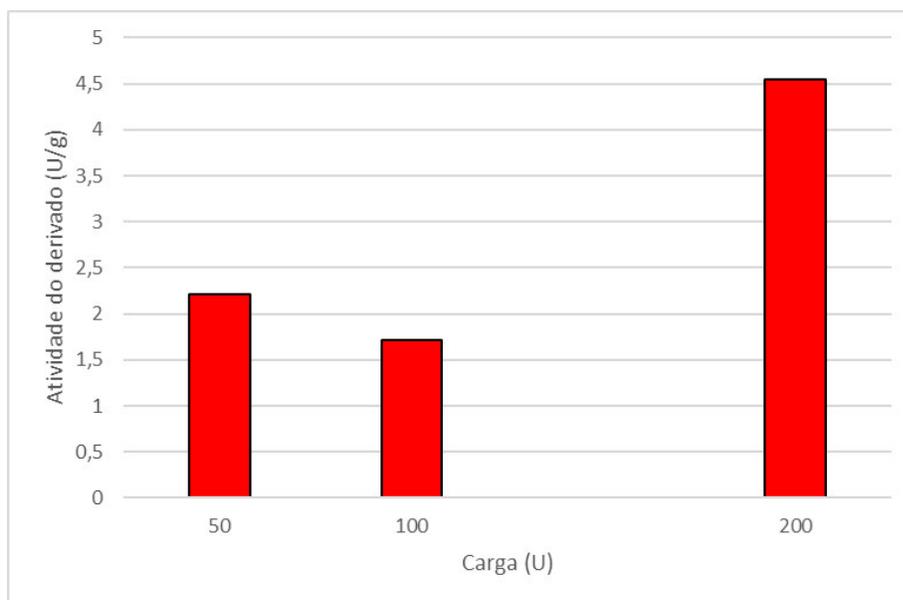
O estudo do efeito da carga oferecida na imobilização foi realizado variando a carga enzimática de 50 U/g à 200 U/g. O resultado pode ser observado no gráfico a seguir (Figura 5)

Tabela 2 Dados de atividade da enzima imobilizada com a carga máxima oferecida.

<b>Amostra Carga(U)</b>	<b>Ativ. derivado(U/g)</b>
50	2,215
100	1,716
200	4,555

Fonte: Próprio Autor

Figura 6 Atividade do derivado em proporções de carga enzimática oferecida



Fonte: Próprio Autor

Pela análise do gráfico acima (Figura 5) é possível observar com o aumento da carga enzimática, obtêm-se um aumento no valor da atividade do derivado, com exceção para as amostras 50 U/g e 100 U/g em que houve um decréscimo. Esse aumento na atividade enzimática ocorre devido ao fato que uma quantidade maior de enzimas aumentando por consequência a ligação à

superfície do suporte. A maior atividade observada foi de 4,55 U/g, valor considerado insatisfatório. Esses baixos valores foram observados em pH básico (pH=10) que não se mostrou adequado sendo substituído para as outras análises por um pH neutro que apresentou melhores resultados para mesma carga oferecida obteve-se uma atividade de 47,17 U/g . Os baixos valores provavelmente foram ocasionados devido a uma conformação inadequada da enzima em que ao se acoplar com o suporte a enzima inutilizou seus sítios ativos, assim apesar de grande quantidade de enzima terem sido imobilizadas a atividade do derivado foi baixa.

#### 4.2. Efeitos da concentração em massa de APTES no núcleo magnético

O efeito da quantidade de APTES (grupamentos amino) presentes e ativos no compósito magnético foi analisado utilizando proporções de MAG/APTES (1:1), (1:3) e (1:4) em massa de APTES realizado a pH neutro (pH = 7). Os resultados obtidos são apresentados na tabela 3 e na figura 7.

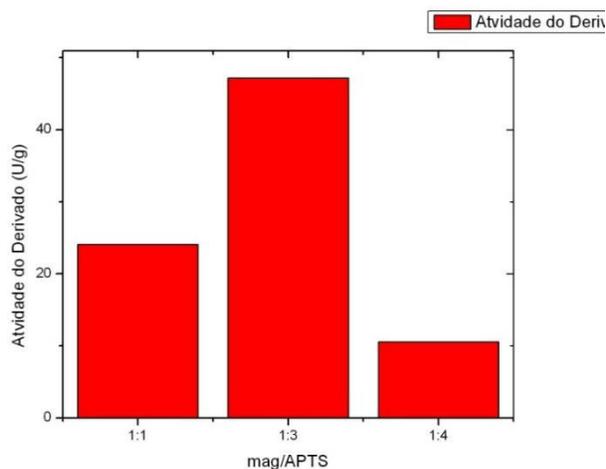
Tabela 3. Parâmetros de imobilização para as diferentes proporções mag/APTES em massa de APTES (1:1, 1:3 e 1:4). Parâmetros: carga oferecida (Q); Rendimento de imobilização (IY) e Atividade do derivado (Atd)

<b>Amostra</b>	<b>Carga (Q)</b>	<b>Ativ. Derivado (U/g)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>1:1</b>	200	24,08	67,3
<b>1:3</b>	200	47,17	82,3
<b>1:4</b>	200	10,54	45,0

Fonte: Próprio Autor

Como pode ser observado na Tabela 3, o melhor rendimento de imobilização foi obtido na proporção 1:3, rendimento igual a 82,3%. O resultado menos satisfatório foi obtido na proporção 1:4, quando o rendimento foi igual a 45%.

Figura 7 : Atividade do derivado em proporções de mag/APTES



Fonte Próprio Autor

A maior proporção mag/APTES concede a magnetita maior quantidade de silano adsorvida na superfície, portanto suporta mais grupamentos amino em sua superfície que facilitam a reticulação com glutaraldeído e em seguida a ligação com a enzima. A solução neutra (pH = 7) facilitou a ligação com regiões enzimáticas não catalíticas, preservando o sítio ativo CALB e elevando a atividade catalítica MNPs / APTES / CALB.

### 4.3. Reações de esterificação do ácido oleico para produção de biodiesel

A tabela abaixo apresenta os resultados obtidos para as reações de esterificação para as seguintes amostras: (Tabela 4)

Tabela 4 Dados de índice de acidez e conversão do biodiesel produzido da reação de ácido oleico com etanol catalisado pelo sistema mag/APTES/CALB em concentrações diferentes de mag/APTES

Amostra	Índice de acidez	Conversão (%)
1:3	14,94	90,65
1:4	44,39	72,25

Fonte: Próprio Autor

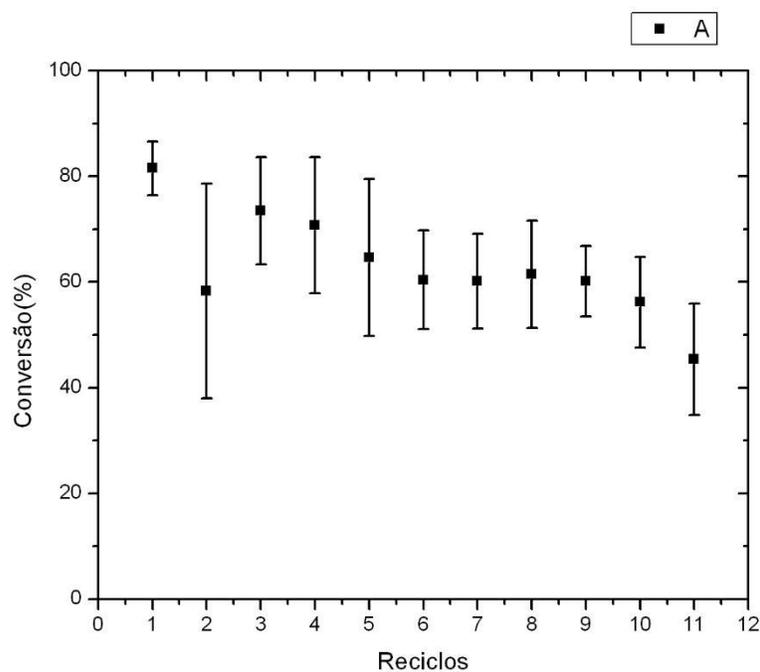
O maior valor obtido de conversão foi obtido para a proporção 1:3 (mag/APTES) igual a 90,65% um valor extremamente satisfatório, Karimi (2016) alcançou uma conversão de 91% , Ban *et al*,2001 obteve 91% de conversão utilizando a enzima *Rhizopus oryzae*, mostrando que

tanto a escolha do suporte bem como a metodologia de ativação e imobilização promoveram bons resultados. Concluindo assim que existe a possibilidade do uso potencial de CALB-NPM em reações de interesse industrial.

#### 4.4. Produção e Estabilidade operacional do Butirato de Etila

A estabilidade operacional do sistema imobilizado foi investigada para a síntese de butirato etila em que os ciclos de reação consecutivos, foram realizados, com reutilização do biocatalisador, usando 0,01 g de CALB-NPM e 8 h, 25°C, 150 rpm, 0,4 mol/L de ácido butírico, 1:1 (ácido butírico: etanol). Volume reacional = 1,0 ml (heptano).

Figura 8 Estabilidade operacional de CALB-NPM (■) em síntese de butirato de etila. Reações foram executadas a 25°C, 8 h, 150 rpm, 0,4 mol/L ácido butírico, 1:1(ácido butírico: etanol). Volume reacional = 1,0 mL. Massa do catalisador = 0,01



Fonte Próprio Autor

O estudo da reutilização do biocatalisador mostra que a enzima imobilizada foi eficiente, pois houve conversão de 80% de ácido butírico em Butirato de Etila, mostrou também que o biocatalisador foi estável, pois após 11 ciclos de 8h horas ainda obteve 45 % de conversão mostrando o uso potencial de CALB-NPM em reações de interesse industrial. Shu et. al. (2011)

avaliou a estabilidade operacional de lipase de *Candida rugosa* imobilizada em suporte de algodão para produção de butirato de etila, obtendo ao final de 12 ciclos uma queda de aproximadamente 15%, obtendo ao final do 12º ciclo uma conversão superior a 80%. Quanto ao estudo de estabilidade operacional realizado por Marina Guillen et. al. (2012), em que foi utilizada lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em diferentes suportes para a produção de butirato de etila, há uma queda de 50% ao final de 6 ciclos, sendo obtida ao final do 6º ciclo uma conversão de 40%.

## CONCLUSÃO

---

O estudo mostrou que as nanopartículas magnéticas funcionalizadas por APTES e glutaraldeído geram um suporte capaz de suportar a enzima ativa CALB, mantendo a atividade catalítica por ciclos de reação consecutivos. A partir dos resultados alcançados, concluiu-se que o recobrimento de silicato proporcionado pelo APTS garantiu uma proteção a oxidação das nanopartículas pelo ar a melhor proporção APTES/MAG foi de 1:3 obtendo uma atividade do derivado de 47,17 U/g e conversão do Biodiesel de 90,65%

Também foi analisado a Produção e Estabilidade operacional do Butirato de Etila, onde o catalisador CALB-NPM mostrou boa manutenção da atividade catalítica durante 11 ciclos consecutivos de reação, mantendo no último ciclo 45% da conversão. Assim, é possível concluir que o uso de CALB-NPM é particularmente vantajoso para a produção de ésteres.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

---

ABU-DIEF, A. & ABDEL-FATAH, S. Development and functionalization of magnetic nanoparticles as powerful and green catalysts for organic synthesis. **In Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**. 2017.

BARRETO, A.; MAIA, F.; SANTIAGO, V.; RIBEIRO, V.; DENARDIN, J.; MELE, G.; CARBONE, L.; LOMONACO, D.; MAZZETTO, S.; FECHINE, P. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. *Microfluidics and nanofluidics*, Springer, p. 1–10, 2011.

BAN, K; KAIEDA, M.; MATSUMOTO, T.; KONDO, A; FUKUDA, H. **Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles**. *Biochem Eng J*, 8 (2001), pp. 39-43

BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., GATTO, G.J., JR & STRYER, L. **Biochemistry**, Eighth edn, W.H. Freeman, New York. 2015.

CAN, K., OZMEN, M. AND ERSOZ, M., Immobilization of albumin on aminosilane modified superparamagnetic magnetite nanoparticles and its characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 71(1), 154-159 .2009.

CHIARADIA, V., VALÉRIO, A., DE OLIVEIRA, D., ARAÚJO, P.H.H. & SAYER, C. Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization, **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 131, pp. 31-35. 2016.

COSTA, V.M., SOUZA, M. C. FECHINE, M. P. B. A., MACEDO, A.C. & GONÇALVES, L. R. B. Nanobiocatalytic systems based on Lipase-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and conventional systems for isoniazid synthesis: a comparative study, **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 33, no. 3, pp. 661-673. 2016.

CORNELL, R.; SCHWERTMANN, U. *The iron oxides: structure, properties, reactions, occurrences and uses*. [S.l.]: Wiley-vch, 2003.

DAS, A., SINGH, J. & K.N, Y. 2017, “Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation”, **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 117, pp. 183-189.

GROSSO, C.; FERREIRA-DIAS, S.; PIRES-CABRAL, P. Modelling and optimization of ethyl butyrate production catalysed by *Rhizopus oryzae* lipase. *Journal of Food Engineering*, Elsevier, 2012.

GÜVENÇ A, KAPUCU N, MEHMETOĞLU U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochem**; 38:379–86. 2002

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized candida antarctica lipase b: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology advances*, Elsevier, 2011.

ITABAIANA Jr.,I; MIRANDA, L.; DE SOUZA, R. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2012

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B.; REETZ, M. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annual Reviews in Microbiology*, Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA, v. 53, n. 1, p. 315–351, 1999.

JEGANNATHAN, K.R. & NIELSEN, P.H. Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review, **Journal of Cleaner Production**, vol. 42, pp. 228-240. 2013.

JEZ, J.M., **Revisiting protein structure, function, and evolution in the genomic era**, Journal of Invertebrate Pathology, vol. 142, pp. 11-15. 2017

JUNIOR, M. A. S. Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro. Programa de PósGraduação em Física, Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Exatas, 2009.

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

HU, B.; PAN, J.; YU, H.; LIU, J.; XU, J. Immobilization of *Serratia marcescens* lipase onto amino-functionalized magnetic nanoparticles for repeated use in enzymatic synthesis of Diltiazem intermediate. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 44, n. 9, p. 1019–1024, 2009.

LEI, L.; BAI, Y.; LI, Y.; YI, L.; YANG, Y.; XIA, C. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, Elsevier, v. 321, n. 4, p. 252–258, 2009.

LIAQUAT, M.; APENTEN, R. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. **Journal of food science**, Wiley Online Library, v. 65, n. 2, p. 295–299, 2008.

KARIMI, M., JENKINS, B. & STROEVE, P. "Multi-objective optimization of transesterification in biodiesel production catalyzed by immobilized lipase: Multi-objective optimization of biodiesel production", *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, vol. 10, no. 6, pp. 804-818. 2016

KHOBBAKHT G, NAJAFI G, KARIMI M, AKRAM A. Optimization of operating factors and blended levels of diesel, biodiesel and ethanol fuels to minimize exhaust emissions of diesel engine using response surface methodology. *Appl Therm Eng*. 2016;99:1006–1017.

KONWARH, R.; KARAK, N.; RAI, S.; MUKHERJEE, A. Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. *Nanotechnology*, IOP Publishing, v. 20, n. 22, p. 225107, 2009.

KORDEL, M.; HOFMANN, B.; SCHOMBURG, D.; SCHMID, R. Extracellular lipase of *Pseudomonas sp.* strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 173, n. 15, p. 4836–4841, 1991.

MARCHETTI, J.; ERRAZU, A. Comparison of different heterogeneous catalysts and different alcohols for the esterification reaction of oleic acid. *Fuel*, Elsevier, v. 87, n. 15, p. 3477–3480, 2008.

MARIA, P. Dominguez de; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; MEER, A. van der; GEMERT, R. van. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. *Journal of molecular catalysis b: enzymatic*, Elsevier, v. 37, n. 1, p. 36–46, 2005.

MARQUES, E. **Funções das Proteínas**. Vestibulando Web, 2014. Disponível em: <<https://www.vestibulandoweb.com.br/biologia/teoria/funcao-proteinas.html>>. Acesso em: 02 de novembro de 2017.

MENDES, A.; CASTRO, H. de; RODRIGUES, D. de S.; ADRIANO, W.; TARDIOLI, P.; MAMMARELLA, E.; GIORDANO, R. de C.; GIORDANO, R. de L. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, Springer, v. 38, n. 8, p. 1055–1066, 2011.

MOORE, A.D., BJÖRKLUND, Å.K., EKMAN, D., BORNBERG-BAUER, E., ELOFSSON, A., Institutionen för biokemi och biofysik, Stockholms universitet & Naturvetenskapliga fakulteten 2008, **Arrangements in the modular evolution of proteins**", *Trends in Biochemical Sciences*, vol. 33, no. 9, pp. 444-451.

MOSSOBA, M.; KRAMER, J.; DELMONTE, P.; YURAWECZ, M.; RADER, J. *Official methods for the determination of trans fat*. [S.l.]: AOCS Press Champaign, IL, 2003.

PANDEY A, BENJAMIN S, SOCCO CR, NIGAM P, KRIEGER N, SOCCOL VT. The realm of microbial lipases in biotechnology. *Biotechnol Appl Biochem*; 29:119–3. 1999

PALMER, T. *Understanding enzymes*. 4. ed. [S.l.]: Oxford: Prentice Hall, 1995.

PEREIRA, M.G., FACCHINI, F.D.A., FILÓ, L.E.C., POLIZELI, A.M., VICI, A.C., JORGE, J.A., FERNANDEZ-LORENTE, G., PESSELA, B.C., GUISAN, J.M. & POLIZELI, MARIA DE LOURDES TEIXEIRA DE MORAES , "Immobilized lipase from *Hypocrea pseudokoningii* on hydrophobic and ionic supports: Determination of thermal and organic solvent stabilities for applications in the oleochemical industry", *Process Biochemistry*, 2015.

PIRES-CABRAL, P., DA FONSECA, M.M.R. & FERREIRA-DIAS, S. 2010, "Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate", *Biochemical Engineering Journal*, vol. 48, no. 2, pp. 246-252.

POLAINA, J., TALENS-PERALES, D. & MARÍN-NAVARRO, J. **Enzymes: Functions and Characteristics**. 2016.

REBELO, L.P., NETTO, CATERINA G. C. M, TOMA, H.E. & ANDRADE, L.H. "Enzymatic kinetic resolution of (RS)-1-(Phenyl)ethanols by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on magnetic nanoparticles", **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 21, no. 8, pp. 1537-1542. 2010.

RIBEIRO, A. (2011), **Proteín**. WikiCiências, Disponível em: <<http://wikiciencias.casadasciencias.org/wiki/index.php/Prote%C3%ADna>>. Acesso em: 02 de novembro de 2017.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 40, n. 1, p. 63–68, 2005.

SÁ, A.; MENESES, A.; ARAÚJO, P; OLIVEIRA, D . A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries, **Food Science & Technology**, Volume 69, Part A, Pages 95-105. 2017,

SARNO, M., IULIANO, M., POLICHETTI, M. & CIAMBELLI, P. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for banana flavour synthesis, **Process Biochemistry**. 2017.

SHU, C., CAI, J., HUANG, L., ZHU, X. & XU, Z, Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth, **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, vol. 72, no. 3, pp. 139-144. 2011.

SILVA, J.; MACEDO, G.; RODRIGUES, D.; GIORDANO, R.; GONÇALVES, L. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. *Biochemical Engineering Journal*, Elsevier, v. 60, p. 16 – 24, 2012. ISSN 1369-703X.

WIERSCHEM, M., WALZ, O., MITSOS, A., TERMUEHLEN, M., SPECHT, A.L., KISSING, K. & SKIBOROWSKI, M. Enzyme kinetics for the transesterification of ethyl butyrate with enzyme beads, coated packing and ultrasound assistance, **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, vol. 111, pp. 25-34. 2017.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M.; PATKAR, S.; JONES, T. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase b from *Candida antarctica*.

*Structure*, Elsevier, v. 2, n. 4, p. 293–308, 1994

VOET, D.; VOET, J. *Biochemistry*. 2. ed. [S.l.]: Wiley, 1995.

XIE, W. & ZANG, X. 2017, "Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil", **Food Chemistry**, vol. 227, pp. 397-403.

YONG, Y.; BAI, Y.; LI, Y.; LIN, L.; CUI, Y.; XIA, C. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. *Process Biochemistry*, Elsevier, v. 43, n. 11, p. 1179–1185, 2008.