

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**MILENA ROCHA LOPES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO NA  
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum***

**Alfenas/MG**

**2023**

**MILENA ROCHA LOPES DA SILVA**

**PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO NA  
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Geotrichum candidum***

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Battaglia Hirata  
Co-Orientador: Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

**Alfenas/MG  
2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central

Rocha Lopes da Silva, Milena.

Produção de nanopartículas magnéticas e aplicação na imobilização da lipase de *Geotrichum candidum* / Milena Rocha Lopes da Silva. - Alfenas, MG, 2023.

66 f. : il. -

Orientador(a): Daniela Battaglia Hirata.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. *Geotrichum candidum*. 2. Nanopartículas. 3. Acetato de cetila. I. Battaglia Hirata, Daniela, orient. II. Título.

MILENA ROCHA LOPES DA SILVA

**“PRODUÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E APLICAÇÃO NA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE GEOTRICHUM CANDIDUM”**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovada em: 12 de abril de 2023

Profa. Dra. Daniela Bataglia Hirata - Presidente e Orientadora  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Daniela Bataglia Hirata, Professor do Magistério Superior**, em 12/04/2023, às 10:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ernandes Benedito Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 12/04/2023, às 10:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano Sindra Virtuoso, Professor do Magistério Superior**, em 12/04/2023, às 10:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0949680** e o código CRC **1CD44F76**.

Dedico este trabalho à Universidade Federal de Alfnas e ao ensino público de qualidade.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço minha mãe, Sergilene, e meu pai, Daniel, pelo apoio incondicional e amor infinito. Vocês foram fundamentais em cada passo dessa jornada.

Também agradeço minha irmã, Marília, por sempre elevar o meu ânimo.

Agradeço ao meu amigo e irmão que a academia proporcionou, Eric, por todas as risadas e pela companhia ao longo dessa pesquisa.

Deixo também meus agradecimentos à Mariana, ao professor Eduardo, meu coorientador, ao Gustavo e à Barbara, por auxiliarem em toda a execução dessa pesquisa.

Agradeço minha orientadora, Daniela, por ter me mantido no caminho, por ter me ensinado tanto ao longo desses anos e por ser forte influência na construção do meu caráter.

Por fim, agradeço a CAPES pela concessão da bolsa, essencial para minha dedicação a este trabalho.

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

## RESUMO

As lipases atuam na hidrólise de triacilgliceróis, produzindo ácidos graxos livres em meios aquosos, mas podem também catalisar reações de síntese em meios isentos ou com baixa quantidade de água. Sua aplicação possui alto interesse industrial, porém sua utilização em larga escala tem o fator econômico como desvantagem, sendo necessária a busca por alternativas que visam superar essa limitação. Uma estratégia para melhorar a relação custo/benefício é o emprego da técnica da imobilização enzimática, a qual proporciona um aumento da estabilidade da enzima no meio reacional, além de auxiliar na sua recuperação, possibilitando a reutilização do biocatalisador. O emprego de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (SPIONs) como suporte na imobilização apresenta vantagens como: a fácil produção, facilidade para modificar a superfície (funcionalização), o que auxilia na imobilização e estabilização da enzima para aplicação, apresentam elevada área superficial e podem ser separadas facilmente do meio de reação com aplicação de um campo magnético. No presente trabalho, o suporte nanomagnético  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foi sintetizado, submetido ao recobrimento com sílica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ), funcionalizado com grupamentos amino ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ) e por fim ativado com glutaraldeído ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ ) para imobilização da lipase produzida por fermentação submersa pelo *Geotrichum candidum* (LGC), que foi comparada com três lipases comerciais de fontes distintas, *Candida rugosa* (LCR), *Pseudomonas fluorescens* (LAK), de pâncreas suíno (LPP) também imobilizadas no mesmo suporte. A caracterização das SPIONs e suas modificações foram realizadas por análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise de área de superfície (BET). As propriedades biocatalíticas para a LGC imobilizada (derivado) foram caracterizadas, sendo determinados pH e temperatura ótimos e estabilidade térmica a 40°C. Observou-se uma atividade ótima para pH 8 e 40°C, tanto para a enzima livre, quanto para a imobilizada. A 40°C o tempo de meia vida ( $t^{1/2}$ ) da LGC imobilizada foi de 223 min, equivalendo a um aumento da estabilidade térmica em aproximadamente 5 vezes quando comparada a LGC livre. O derivado foi aplicado na síntese do éster de cera acetato de cetila, sendo utilizado um planejamento completo central rotacional (DCCR) para a otimização da reação. A máxima conversão obtida foi de  $35,56 \pm 1,56$  % m/v para o tempo de 120 min de reação utilizando-se uma concentração de derivado de 8% (m/v) e temperatura de

40°C. O derivado manteve praticamente toda a sua atividade inicial após 6 ciclos de reutilização.

Palavras-chave: lipase; *Geotrichum candidum*; nanopartículas; acetato de cetila.

## ABSTRACT

Lipases catalyze the hydrolysis of triacylglycerols, producing free fatty acids in aqueous media, but they can also catalyze synthesis reactions in media free or with a low amount of water. Its application has high industrial interest, but its use on a large scale has the economic factor as a downside, making it necessary to search for alternatives that aim to overcome this limitation. A strategy to improve the cost/benefit ratio is the use of the enzymatic immobilization technique, which increases the stability of the enzyme in the reaction medium and assists in its recovery, allowing the reuse of the biocatalyst. The use of magnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as support in immobilization has advantages since SPIONs are easy to obtain, allowing modifications on their surface (functionalization) that help in the immobilization and stabilization of the enzyme for its application, have a high area surface and can be easily separated from the reaction medium by applying a magnetic field. In the present work, the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanomagnetic support was synthesized, subjected to silica coating (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>), functionalized with amino groups (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>) and finally activated with glutaraldehyde (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-CHO) for lipase immobilization produced by submerged fermentation by *Geotrichum candidum* (GCL), which was compared with three commercial lipases from different sources, *Candida rugosa* (CRL), *Pseudomonas fluorescens* (AKL), from porcine pancreas (PPL) also immobilized on the same support. The characterization of SPIONs and their modifications were performed by scanning electron microscopy (SEM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and surface area analysis (BET). The biocatalytic properties for the immobilized (derived) GCL were characterized, determining optimal pH and temperature and thermal stability at 40°C. Optimum activity was observed at pH 8 and 40°C, both for free and immobilized enzymes. At 40°C, the half-life (t<sub>1/2</sub>) of immobilized GCL was 223 min, equivalent to an increase in thermal stability of approximately 5 times when compared to free GCL. The derivative was applied in the synthesis of cetyl acetate wax ester, using a central composite rotational design (CCRD) for the optimization of the reaction. The maximum conversion obtained was 35.56 ± 1.56% m/v for a reaction time of 120 min using a derivative concentration of 8% (m/v) and temperature of 40°C. The derivative retained virtually all of its initial activity after 6 reuse cycles.

Keywords: lipase; *Geotrichum candidum*; nanoparticles; cetyl acetate.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Comportamento dos fenômenos magnéticos.....	19
Figura 2 - Estrutura do cristal de magnetita .....	20
Figura 3 - Diferenças entre o multi e monodomínio magnético na presença e ausência de um campo magnético externo .....	21
Figura 4 - A influência do diâmetro da partícula em seu comportamento magnético .....	22
Figura 5 - Modificação da superfície da SPION .....	24
Figura 6 - Mecanismo da ativação interfacial das lipases .....	26
Figura 7 - A ligação covalente de lipases em um suporte utilizando glutaraldeído como agente reticulante.....	27
Figura 8 - Artrósporos de <i>G. candidum</i> obtidos por microscopia eletrônica de varredura .....	29
Figura 9 - Fórmula molecular bidimensional do éster acetato de cetila.....	31
Figura 10 - Esquema das etapas envolvidas na modificação da superfície das SPIONs.....	42
Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura dos materiais $Fe_3O_4$ (A), $Fe_3O_4@SiO_2$ (B), $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ (C) e $Fe_3O_4@SiO_2-CHO$ (D) .....	43
Figura 12 - Espectros de FTIR para as nanopartículas preparadas de $Fe_3O_4$ , $Fe_3O_4@SiO_2$ , $Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$ e $Fe_3O_4@SiO_2-CHO$ .....	44
Figura 13 - Comparação das atividades relativas obtidas para diferentes valores de pH entre a LGC livre e a imobilizada em $Fe_3O_4@SiO_2-CHO$ .....	49
Figura 14 - Comparação das atividades relativas entre a LGC livre e imobilizada em SPION em diferentes temperaturas .....	50
Figura 15 - Gráfico de inativação térmica da LGC imobilizada em $Fe_3O_4@SiO_2-CHO$ .....	51
Figura 16 - Diagrama de Pareto para as variáveis independentes, concentração de derivado e temperatura .....	53
Figura 17 - Superfície de resposta para a conversão obtida acetato de cetila em função da variação da concentração de derivado e temperatura, catalisada pela LGC imobilizada em $Fe_3O_4@SiO_2-CHO$ .....	55

Figura 18 - Curva de contorno para a conversão obtida de acetato de cetila em função da variação da concentração de derivado e temperatura, catalisada pela LGC imobilizada em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ .....	56
Figura 19 - Efeito do tempo de reação para a conversão de acetato de cetila catalisada pela LGC imobilizada em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ ao longo de 420 min.....	56
Figura 20 - Estabilidade operacional do derivado após sucessivos ciclos de 2 h cada para a síntese de acetato de cetila .....	57

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Enzimas usadas para imobilização em MNPs e suas aplicações. ....	23
Quadro 2 - Lipases imobilizadas em SPIONs com aplicação industrial. ....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis do DCCR 22 com seus respectivos níveis e valores reais .....	37
Tabela 2 - Valores de área superficial, volume e tamanho de poro dos materiais sintetizados .....	45
Tabela 3 - Comparativo dos parâmetros relativos à imobilização das lipases de diferentes fontes no suporte sintetizado .....	46
Tabela 4 - Matriz do DCCR 22 para a determinação da conversão obtida para o acetato de cetila após 60 min de reação .....	52
Tabela 5 - Coeficientes de regressão obtidos para DCCR 22, utilizando-se 5% de nível de significância .....	53
Tabela 6 - Coeficientes de regressão significativos, erro padrão e p-valores para a conversão de acetato de cetila obtida, utilizando 5% de nível de significância .....	54
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo somente com os parâmetros significativos, utilizando-se 5% de nível de significância ..	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
APTES	(3-aminopropil) trietoxilano
BET	Análise de área de superfície por isotermas Brunauer, Emmett e Teller
$D_c$	Diâmetro crítico
DCCR	Delineamento composto central rotacional
$k_d$	Constante de inativação
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
$Fe_3O_4$	Nanopartículas de magnetita
$Fe_3O_4@SiO_2$	Nanopartículas de magnetita revestidas com TEOS
$Fe_3O_4@SiO_2-CHO$	Nanopartículas de magnetita revestidas com TEOS e funcionalizada com grupamentos amino e ativada com glutaraldeído
$Fe_3O_4@SiO_2-NH_2$	Nanopartículas de magnetita revestidas com TEOS e funcionalizada com grupamentos amino
<i>G. candidum</i>	<i>Geotrichum candidum</i>
LAK	Lipase AK de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LGC	Lipase de <i>Geotrichum candidum</i>
LPP	Lipase de pâncreas de porco
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MNP	<i>Magnetic nanoparticle</i>
PEI	Polietilenimina
pNPB	P-nitrofenil butirato
SPION	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticle</i> (nanopartícula de óxido de ferro superparamagnética)
$t^{1/2}$	Tempo de meia vida
TEOS	Tetraetil ortosilicato

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
2.1	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO .....	18
2.2	MAGNETISMO .....	20
2.3	PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DAS SPIONS .....	22
2.4	MODIFICAÇÕES DA SUPERFÍCIE DAS SPIONS .....	23
2.5	LIPASES .....	25
2.6	LIPASES DE <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i> .....	28
2.7	PRODUÇÃO DE ÉSTERES – ACETATO DE CETILA .....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>32</b>
3.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	32
3.2	PRODUÇÃO DA LIPASE DE <i>GEOTRICHUM CANDIDUM</i> – LGC .....	32
3.3	SÍNTESE DAS SPIONS .....	33
3.4	FUNCIONALIZAÇÃO COM TEOS .....	33
3.5	FUNCIONALIZAÇÃO COM APTES .....	34
3.6	ATIVAÇÃO DO SUPORTE .....	34
3.7	IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES .....	34
3.8	CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE .....	35
<b>3.8.1</b>	<b>Microscopia eletrônica de varredura (MEV)</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)</b> .....	<b>35</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Análise de área de superfície (BET)</b> .....	<b>36</b>
3.9	PROPRIEDADES CATALÍTICAS DO SUPORTE .....	36
3.10	ESTABILIDADE TÉRMICA .....	36
3.11	REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO .....	37
3.12	ESTABILIDADE OPERACIONAL .....	38
3.13	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA AS ENZIMAS COMERCIAIS .....	38
3.14	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA A LGC .....	39
3.15	QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA .....	40
3.16	PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO .....	40
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>41</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS .....	42

4.2	AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE DIFERENTES LIPASES NO SUPORTE SINTETIZADO.....	46
4.3	EFEITOS DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA ....	49
4.4	ESTABILIDADE TÉRMICA.....	50
4.5	REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO .....	51
4.5	ESTABILIDADE OPERACIONAL .....	57
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Com a união de diversos países em prol da redução do impacto ambiental de suas indústrias, com grandes acordos assinados desde o importante Estocolmo-72, e com destaque para o *European Green Deal* (Acordo Verde Europeu), que estipulou metas ambiciosas para a adequação ambiental da indústria europeia até 2050, entre elas a abolição do uso de combustíveis fósseis e o fim da emissão de substâncias tóxicas (“A European Green Deal”, 2021), a busca por meios que tornem a catálise química menos frequente em processos industriais tem se intensificado.

A biocatálise já demonstrou ser capaz de reduzir drasticamente o impacto ambiental de diversos processos, sendo amplamente estudada e cada vez mais aplicada desde sua popularização a partir dos anos 2000, apoiando-se no desenvolvimento de diferentes setores como a bioinformática e a engenharia genética, que permitiram a descoberta e documentação de novas enzimas e também possibilitaram a produção de biocatalisadores mais potentes. Porém, apesar de suas vantagens claras, a biocatálise esbarra na questão econômica, sendo a obtenção de enzimas um processo oneroso e que, quando aplicadas em larga escala, geram um retorno financeiro inferior à catálise química (WU *et al.*, 2021).

Por isso, é importante que a preocupação com a viabilidade econômica ocorra desde a escala laboratorial, explorando meios de obtenção de enzimas de interesse industrial que sejam mais baratos, além do uso de métodos estatísticos, como o planejamento de experimentos, que permitam a determinação com maior fidelidade das condições de reação passíveis de utilização industrial (WOODLEY, 2020). Outro método utilizado que visa aumentar a viabilidade de processos catalisados por enzimas é a imobilização do biocatalisador em um suporte, permitindo a sua recuperação do meio reacional e sua reutilização (WU *et al.*, 2021).

A imobilização enzimática em suportes poliméricos tende a ser o caminho mais estudado, porém, a aplicação de nanopartículas magnéticas para o mesmo fim tem sido mais explorada nos últimos anos, tendo em vista que sua aplicação em processos industriais pode acarretar em maiores produções e, principalmente, facilitar a fase de purificação e recuperação do produto de interesse do meio de reação (*downstream*) considerando o fato de que o biocatalisador pode ser recuperado utilizando-se apenas um ímã, eliminando assim etapas adicionais de filtração ou centrifugação, que

precisam ser aplicadas quando o biocatalisador está imobilizado em suporte não magnético (BILAL *et al.*, 2018; VAGHARI *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2020).

O fungo *Geotrichum candidum* (*G. candidum*) é amplamente estudado por produzir diferentes enzimas de alto interesse industrial e dentre elas estão as lipases, que são enzimas muito utilizadas nas indústrias farmacêutica, têxtil, química, cosmética, na produção de biocombustíveis entre outras aplicações. Suas lipases podem possuir alta especificidade por substratos, sendo possível a sua produção com o emprego de um meio de cultivo de baixo custo, segundo Castro *et al.* (2016) e Maldonado *et al.* (2012).

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo produzir nanopartículas magnéticas para serem aplicadas na imobilização da lipase produzida por cultivo submerso pelo *G. candidum*. O suporte produzido e com as modificações realizadas em sua superfície foi caracterizado por BET, FTIR e MEV. A LGC foi imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  e comparada com três lipases comerciais: LPP, LAK e LCR.

As propriedades catalíticas da LGC imobilizada foram determinadas e comparadas com sua forma livre e ainda o derivado obtido foi utilizado para síntese do éster cosmético acetato de cetila, sendo utilizado um DCCR de duas variáveis independentes para a otimização do processo.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE ÓXIDO DE FERRO

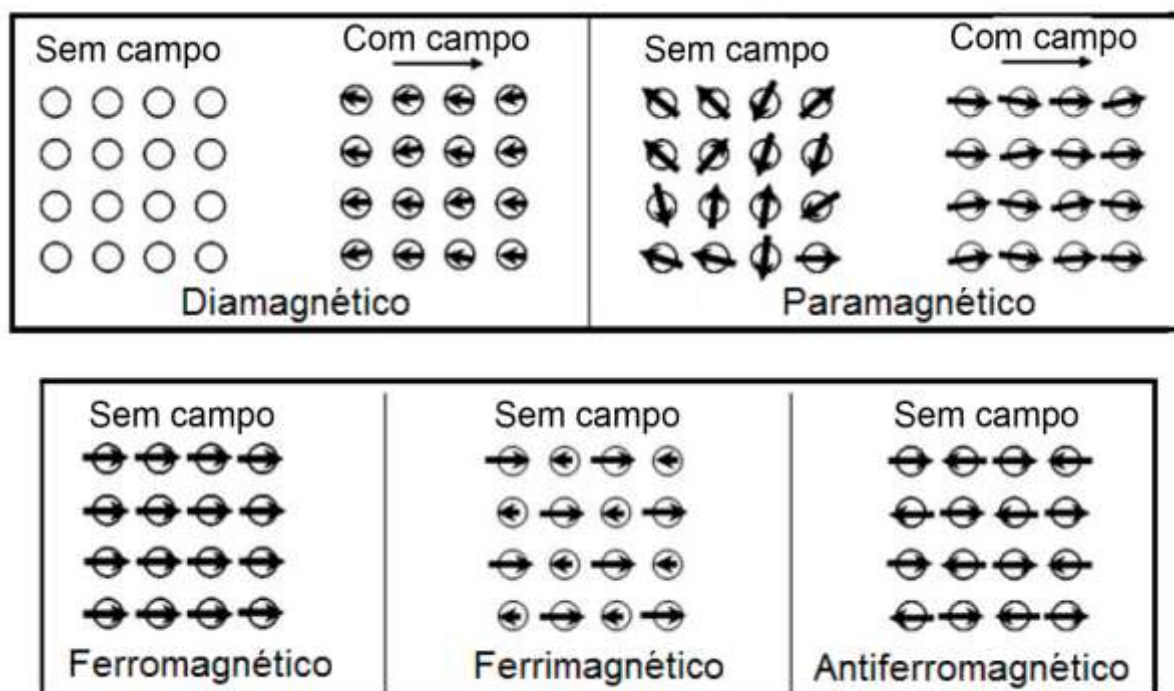
A nanotecnologia, termo criado por Norio Taniguchi em 1974, se popularizou na década de 80, trazendo grandes expectativas quanto a sua aplicabilidade com o avanço das pesquisas. Naquele momento, já se compreendia que à medida que o tamanho de um material diminuía, certas características de grande interesse se magnificavam (FRANKS; 1987).

Dentro da nanotecnologia, as nanopartículas são materiais relevantes em diversas áreas, e isso se dá pelo fato de que, embora pequenas em tamanho, nanopartículas possuem uma grande relação área/volume, implicando em grande área superficial, e alta resistência mecânica. Unidas a outros fatores, estas características têm se demonstrado importantes para pesquisas e indústrias, considerando sua aplicação em medicamentos, diagnóstico por imagem em vários tecidos, eletrônicos e diversos outros produtos (BILAL *et al.*, 2018; DADFAR *et al.*, 2019; KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

O caráter magnético pode estar presente em algumas nanopartículas, a depender do material do qual ela é constituída e, conseqüentemente, da suscetibilidade magnética desse material (a razão entre a magnetização induzida e o campo magnético aplicado) (KOLHATKAR *et al.*, 2013).

A forma como ocorre a interação entre a nanopartícula e um campo magnético externo gera classificações como: ferromagnetismo, ferrimagnetismo, diamagnetismo, antiferromagnetismo ou paramagnetismo (CAIZER; RAI, 2021; KHAN; SAEED; KHAN, 2017; KOLHATKAR *et al.*, 2013). O comportamento dessas classificações pode ser observado na Figura 1.

Figura 1 - Comportamento dos fenômenos magnéticos.

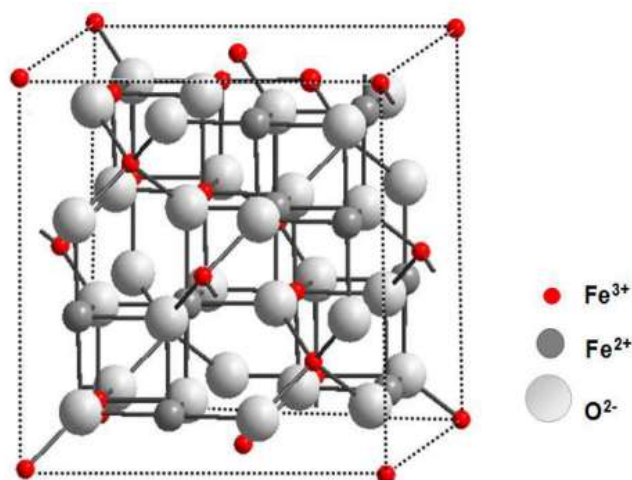


Fonte: Adaptado de KOLHATKAR *et al.* (2013)

Há também substâncias como o óxido de ferro III ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e óxido de ferro II ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), respectivamente magnetita (Figura 2) e maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), que se classificam como superparamagnéticas (quando em escala nanométrica), o que implica em um magnetismo mais forte do que partículas simplesmente paramagnéticas (CAIZER; RAI 2021). O comportamento superparamagnético foi primeiramente descrito em 1950, por Néel, mais de um século após o termo paramagnetismo ter sido cunhado por Faraday, em 1845 (GOODING, 1981).

Uma característica importante do superparamagnetismo em relação ao paramagnetismo também é o fato de que, a partir do momento que o campo magnético externo é removido, a atração entre as partículas superparamagnéticas deixa de ocorrer imediatamente, o que impede aglomerações por interações magnéticas (KOLHATKAR *et al.*, 2013).

Figura 2 - Estrutura do cristal de magnetita.



Fonte: CARRIAZO BAÑOS; NOVAL LARA; OCHOA PUENTES (2017).

Na literatura, nanopartículas magnéticas são nomeadas como MNPs (*magnetic nanoparticles*), ao passo que, quando constituídas de ferro, podem também ser classificadas como SPIONs (*superparamagnetic iron oxide nanoparticles*) (CAIZER; RAI, 2021).

## 2.2 MAGNETISMO

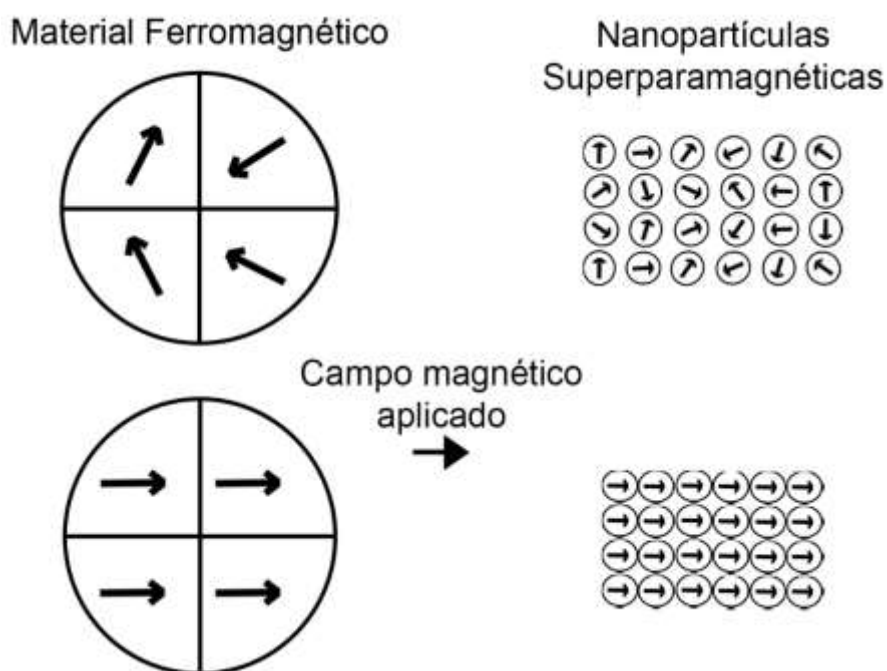
O magnetismo está ligado ao comportamento do spin dos elétrons e sua distribuição nos orbitais. Elementos que possuem todos os elétrons emparelhados em seus orbitais não possuem o caráter magnético. Isso acontece pois, quando emparelhados, as forças dos elétrons se anulam, impossibilitando a atração por um campo magnético externo, porém, certos materiais compostos por calcitas, quartzo, prata e ouro são diamagnéticos, ou seja, na presença de um campo magnético externo, seus momentos magnéticos se alinham no sentido oposto, fazendo com que sejam repelidos (SWAIN, 2021).

Entretanto, quando há um elétron desemparelhado na orbital, a atração pelo campo magnético externo ocorre. A intensidade da interação de certo material com um campo magnético externo é diretamente proporcional a quantidade de elétrons desemparelhados em sua constituição (CAIZER; RAI, 2021).

Há ainda outro fator relevante para a intensidade do magnetismo induzido em um material, o denominado diâmetro crítico ( $D_c$ ). O  $D_c$  se relaciona com o domínio magnético, como demonstrado nas Figuras 3 e 4. Quanto maior for o material

magnético, mais domínios ele possui, direcionados de formas diferentes, aleatórias. Porém, à medida que o tamanho do material diminui, também diminuem a quantidade de domínios magnéticos até que, ao atingir um tamanho inferior ao  $D_c$ , ocorre o monodomínio, sendo este fenômeno responsável por permitir o alinhamento simultâneo de milhares de SPIONs com o campo magnético externo, gerando uma interação de alta intensidade entre ambos (CAIZER; RAI, 2021; DUAN *et al.*, 2018).

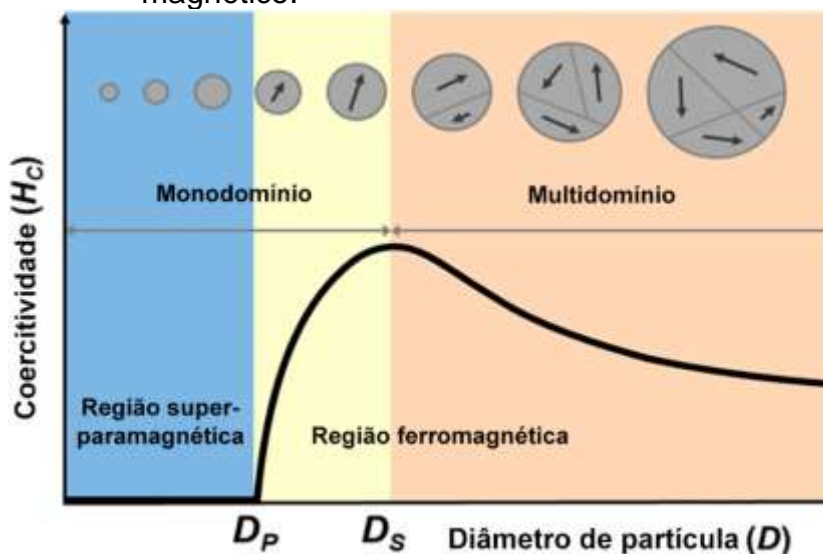
Figura 3 - Diferenças entre o multi e monodomínio magnético na presença e ausência de um campo magnético externo.



Fonte: Autora (2023).

O  $D_c$  para nanopartículas magnéticas esféricas é de 10 a 20 nm segundo Bilal *et al.* (2018) e Khan, Saeed, Khan (2017), porém, para Caizer, Rai (2021), o  $D_c$  é considerado um valor abaixo de 30 nm.

Figura 4 - A influência do diâmetro da partícula em seu comportamento magnético.



Fonte: Adaptado de SUNG LEE *et al.* (2015).

### 2.3 PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DAS SPIONS

Uma das vias de obtenção das SPIONS é a coprecipitação, uma forma rápida e muito utilizada, que tem como vantagens o alto rendimento, de acordo com Franqui *et al.* (2015) e Lu, Salabas, Schüth (2007), o controle sobre o tamanho e formato das nanopartículas e o tempo reduzido de reação (CAIZER; RAI, 2021). A técnica consiste na reação de sais de ferro com uma base em temperaturas que podem variar entre 70 e 80 °C (CAIZER; RAI, 2021). O alvo da reação é que seja formada a magnetita, porém, este material é muito suscetível a se oxidar para maghemita, dessa forma, manter a reação em ambiente inerte é essencial (FRANQUI *et al.*, 2015; LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

Na área da biocatálise, via de produção emergente nas indústrias alimentícias, farmacêuticas, têxteis, biocombustíveis – e diversas outras – as SPIONS se tornaram uma alternativa para a solução de um problema inerente às enzimas: a instabilidade e a recuperação dificultada do meio de reação depois de finalizada a catálise. As enzimas das classes oxirredutases, transferases e hidrolases, possuem características que possibilitam sua ampla aplicação na imobilização em SPIONS (BILAL *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2018).

Embora a imobilização enzimática em suportes poliméricos, de origem orgânica e inorgânica, seja frequentemente utilizada para garantir a estabilização e facilitar o

processo de reutilização da enzima, as MNPs têm como vantagens sobre tais suportes uma área superficial elevada, o que traz a possibilidade de suportar um carregamento enzimático superior, fato que é reforçado também pela baixa porosidade ou, muitas vezes, até pela ausência de poros nos materiais nanométricos, o que praticamente elimina a possibilidade de problemas difusionais. Por fim, o superparamagnetismo e o ferromagnetismo facilitam o processo da recuperação das enzimas do meio de reação, o que se torna uma vantagem não apenas sobre suportes poliméricos, mas também sobre suportes nanométricos com a ausência do magnetismo (BILAL *et al.*, 2018; VAGHARI *et al.*, 2016; ZHONG *et al.*, 2020).

Diferentes enzimas (Tabela 1) foram objetos de estudo para a imobilização enzimática em MNPs, como destaca o trabalho de Seenuvasan *et al.* (2018), evidenciando que a indústria biotecnológica se interessa cada vez mais por esse tipo de suporte.

Quadro 1 - Enzimas usadas para imobilização em MNPs e suas aplicações.

<b>Enzima</b>	<b>Suporte</b>	<b>Aplicação</b>
Lipase de <i>Mucor javanicus</i>	MNP@APTES	Conversão de ácidos graxos em diacil-glicerol
$\alpha$ -amilase	MNP modificada com goma-arábica	Hidrólise do amido
Lactase	MNP funcionalizada com ácido carboxílico	Análise da lactose
Pectinase	MNP modificada com dioctil sulfosuccinato de sódio	Hidrólise da pectina
Amiloglucosidase	MNP@CLEA	Produção de glicose
$\beta$ -galactosidase	MNP modificada com álcool polivinílico	Degradação do amido

Fonte: Adaptado de SEENUVASAN *et al.* (2018).

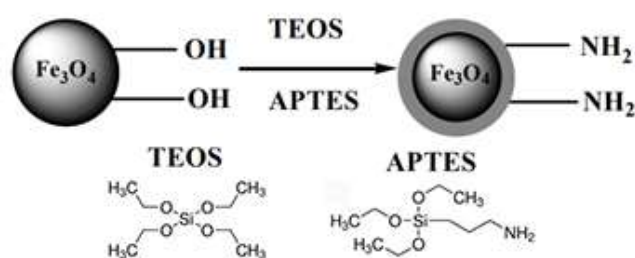
## 2.4 MODIFICAÇÕES DA SUPERFÍCIE DAS SPIONS

Considerando o fato de que as SPIONS são altamente suscetíveis à oxidação e que uma maior compatibilidade com a enzima a ser imobilizada deve ser conferida ao suporte, é necessária a modificação e funcionalização da SPION, o que se torna um processo facilitado pela presença abundante de grupos hidroxila na superfície do material (BILAL *et al.*, 2018; ZDARTA *et al.*, 2018).

A fim de recobrir e funcionalizar a superfície das SPIONs, diferentes compostos têm sido utilizados tais como aminosilanos, quitosana carbodiimida e sílica. A sílica é um material quimicamente inerte e um dos agentes modificadores de superfície mais utilizados, possuindo como função proteger a nanopartícula da oxidação, impedir a agregação entre as partículas e também disponibilizar o grupo silanol para uma possível modificação posterior (BILAL *et al.*, 2018, ZHONG *et al.*, 2020).

Assim, a superfície da sílica pode ser facilmente funcionalizada; tornando as nanopartículas adaptáveis a muitas aplicações. Uma representação esquemática envolvendo o recobrimento das SPIONs com sílica e funcionalização com um grupamento amina está mostrada na Figura 5.

Figura 5 - Modificação da superfície da SPION.



Fonte: Adaptado de DADFAR *et al.* (2019).

Nota: Onde APTES é abreviação para 3-aminopropil trietoxilano e TEOS para tetraetil ortosilicato.

O processo de modificação da superfície de SPIONs com sílica e um grupamento amina é aplicado com frequência, visando diferentes usos do material, como demonstra o trabalho desenvolvido por Kurnaz Yetim *et al.* (2021), onde as SPIONs modificadas foram aplicadas para o uso em diagnóstico por imagem. Já Hatami *et al.* (2019, 2022) utilizou as nanopartículas como potenciais bactericidas, ao passo que Seenuvasan *et al.* (2018), demonstrou diversos casos onde a imobilização enzimática se deu em suportes modificados desta forma.

Especialmente, no revestimento de sílica, a reação entre um grupo silanol e vários agentes de acoplamento fornece uma ligação covalente com ligantes específicos nas superfícies das SPIONs (BILAL *et al.*, 2018). As SPIONs com revestimento de sílica apresentam boa estabilidade contra solventes orgânicos, propriedade antibacteriana, facilidade de separação e recuperação. Essas

propriedades tornam as SPIONs com modificações em sua superfície um suporte ideal para imobilização de enzimas e também exibem excelentes propriedades de biocompatibilidade e hidrofiliçidade (SEENUVASAN *et al.*, 2018).

## 2.5 LIPASES

As lipases (triacilglicerol hidrolases - E.C. 3.1.1.3) são enzimas que hidrolisam lipídios em meios aquosos e realizam a reação de esterificação, transesterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise na ausência de água. As lipases são enzimas de grande interesse industrial devido a sua alta aplicabilidade em diversos setores, como na produção de bebidas, papel, remédios, detergentes, biocombustíveis e dezenas de outros produtos (ABDULMALEK; YAN, 2022).

Entretanto, algumas limitações estão associadas ao uso das lipases em sua forma livre (solúvel), tais como uma baixa estabilidade operacional e dificuldades de recuperação, o que eleva o custo operacional para o emprego da catálise enzimática em processos industriais. Por esse motivo, a imobilização enzimática é uma alternativa para remediar essas limitações, como descreve Mateo *et al.* (2007), permitindo a recuperação das enzimas ao final do processo e proporcionando uma maior estabilidade frente às condições de reação mais severas (HERNANDEZ; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011)

As lipases são principalmente glicoproteínas, com pesos moleculares que variam entre 19 e 60 kDa e têm como característica marcante a presença da *lid* (tampa), estrutura que recobre o sítio ativo da lipase e que se “abre” na presença de substrato, sendo este processo denominado de ativação interfacial (ABDULMALEK; YAN, 2022).

A ativação interfacial, demonstrada na Figura 6, é muitas vezes explorada para a imobilização de lipases, por meio de suportes hidrofóbicos que adsorvem as lipases, deixando seu sítio ativo exposto ao meio reacional. Porém, nesse método, as ligações que mantêm a lipase adsorvida no suporte são fracas, sendo o desligamento do suporte uma possibilidade, como demonstra Abdulmalek, Yan (2022), além do impedimento estérico gerado quando são empregados altos carregamentos enzimáticos na imobilização, um dos dificultadores para o rendimento de reações (FERREIRA *et al.*, 2018).

Figura 6 - Mecanismo da ativação interfacial das lipases.

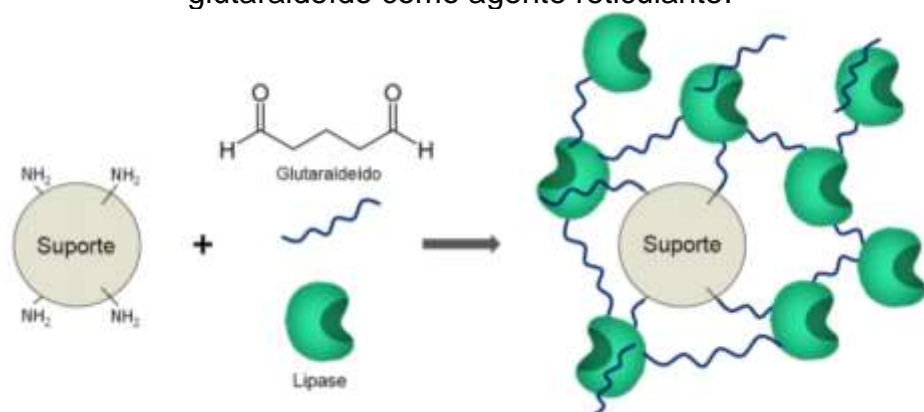


Fonte: Autora (2023).

Outro método muito aplicado para a imobilização de enzimas é a ligação covalente. Como o próprio nome sugere, neste método de imobilização as lipases são imobilizadas no suporte por ligações químicas do tipo covalente. Essas ligações surgem de reações químicas entre os suportes e as cadeias laterais de aminoácidos presentes na superfície das lipases, como lisina, cisteína, ou resíduos de ácido aspártico e glutâmico, que podem ter grupos funcionais como hidroxilamina, carboxílico, imidazol e fenólicos, que também são favoráveis para a formação de ligações covalentes (CIRILLO *et al.* 2014). A imobilização covalente, por possuir uma forte ligação química, proporciona uma elevada fixação das lipases ao suporte e uma boa estabilidade enzimática, pois proporciona uma rigidificação da estrutura da enzima (MATEO *et al.*, 2007). Essa rigidificação faz com que a estrutura da enzima permaneça inalterada na presença de agentes desnaturantes como calor, solventes orgânicos, pH extremo e outros (GONÇALVES FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). No entanto, a ligação covalente também pode alterar o sítio ativo da lipase levando a sua inativação.

Outra forma de melhorar a ligação da enzima ao suporte é a utilização de reagentes de reticulação. Um dos reagentes de reticulação mais comumente usados na ativação do suporte é o glutaraldeído, como ilustra a Figura 7 (BASSO; SERBAN, 2019; ZDARTA *et al.*, 2018). Este reagente possui grupos aldeídos que podem interagir com o suporte e simultaneamente com os grupos amino da enzima proporcionando a ligação covalente e formando uma amida que mantém a rigidez da interação (ZDARTA *et al.*, 2018).

Figura 7 - A ligação covalente de lipases em um suporte utilizando glutaraldeído como agente reticulante.



Fonte: Adaptado de TACIAS-PASCACIO (2019).

Existem outras diferentes técnicas para a imobilização de lipases que são utilizadas, como por exemplo o encapsulamento e os agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), visando superar as desvantagens decorrentes da utilização destas enzimas em sua forma livre (ABDULMALEK; YAN, 2022; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Com este mesmo objetivo, as pesquisas envolvendo a imobilização de lipases em nanopartículas têm crescido, especialmente em nanopartículas magnéticas, visto suas claras vantagens, como demonstram os trabalhos de Thangaraj *et al.* (2017, 2019) e Miao *et al.* (2018), que utilizaram lipases imobilizadas em SPIONs para a produção de biodiesel, assim como Yang *et al.* (2019) e Adnan *et al.* (2020), que, respectivamente, analisaram o comportamento de lipases de *Rhizopus oryzae* e *Candida rugosa* imobilizadas em SPIONs.

Outros exemplos de aplicação das lipases imobilizadas em suportes magnéticos para aplicação em diferentes setores de interesse industrial estão sumarizados na Tabela 2.

Quadro 2 - Lipases imobilizadas em SPIONs com aplicação industrial.

Fonte	Suporte	Aplicação	Referência
<i>Pseudomonas mendocina</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com sílica	Produção de biodiesel	Chen <i>et al.</i> , 2016
<i>Candida antarctica</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com APTES	Produção de biodiesel	Cruz-Izquierdo <i>et al.</i> , 2014
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com APTES	Produção de biodiesel	Zhang <i>et al.</i> , 2015
<i>Aspergillus oryzae</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com poli(acrilonitrila)	Produção de biodiesel	Paitaid; Aran, 2020
<i>Candida antarctica</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com poli (glicidil metacrilato)	Produção de biodiesel	Ngo <i>et al.</i> , 2013
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com poli (glicidil metacrilato)	Produção de biodiesel	Ngo <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Micropartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> recobertas com sílica	Produção de butil butirato	Kopp <i>et al.</i> , 2015
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Nanopartículas magnéticas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Resolução do (R,S)-2- octanol	Liu <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Adaptado de DEL ARCO *et al.* (2021).

## 2.6 LIPASES DE *GEOTRICHUM CANDIDUM*

O *G. candidum*, demonstrado na Figura 8, é um fungo com características de levedura, abundantemente presente no leite e derivados, solo, frutas, cereais, ar e diversos outros ambientes. A principal aplicação do *G. candidum* se dá na fabricação de queijos, porém na área de biocatálise, as lipases produzidas pelo fungo vêm ganhando destaque (ELISKASES-LECHNER; GUÉGUEN; PANOFF, 2011).

O *G. candidum* produz uma vasta gama de enzimas, dentre elas proteases, glucanases, celulases e lipases (ELISKASES-LECHNER; GUÉGUEN; PANOFF, 2011). As lipases produzidas pelo fungo são extracelulares quando há a presença de uma fonte de carbono de origem lipídica que induza a produção (FERREIRA *et al.*, 2018).

Figura 8 - Conídias de *G. candidum*.



Fonte: PaDIL (2014).

Algumas lipases de *G. candidum* possuem uma alta especificidade pelo substrato, mais especificamente ácidos graxos insaturados com dupla ligação *cis* no C-9. Esse tipo de especificidade é de grande interesse nas indústrias que lidam com materiais lipídicos como a indústria cosmética, farmacêutica e de biocombustíveis, pois proporciona que a reação de hidrólise das ligações ésteres, presentes nos lipídios que contenham estes ácidos graxos, ocorra a uma elevada velocidade (MALDONADO *et al.*, 2017).

A catálise de reações de hidrólise é a principal função desempenhada pelas lipases de *G. candidum*, como descrevem Eliskases-lechner, Guéguen, Panoff, (2011) e Maldonado *et al.* (2017), porém elas também podem catalisar reações de esterificação em meios isentos de água (MALDONADO *et al.*, 2017). Ferreira *et al.* (2019), demonstrou o desempenho da lipase livre de *G. candidum* na hidrólise de óleos de diferentes fontes, enquanto Santos *et al.* (2021), realizou a produção de decil oleato por meio da esterificação, utilizando a lipase imobilizada de *G. candidum* como biocatalisador.

## 2.7 PRODUÇÃO DE ÉSTERES – ACETATO DE CETILA

Devido a maior conscientização da sociedade sobre a importância de preservação do meio ambiente, a indústria cosmética vem desenvolvendo alternativas às rotas químicas para síntese de cosméticos, que sejam sustentáveis e seguras ao meio ambiente, ou seja, produtos naturais e livres de produtos químicos (KHAN; RATHOD, 2015). A biocatálise possui uma vantagem distinta sobre a rota química em termos de simplificação de processos, qualidade do produto e redução na formação de resíduos. Dentre as enzimas, as lipases são mais comumente utilizadas para as sínteses de produtos da indústria cosmética, pois possuem a capacidade de catalisar um grande número de reações (KHAN; RATHOD, 2015).

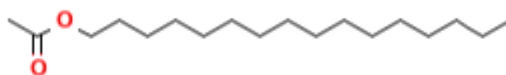
Os ésteres cosméticos podem ser sintetizados por esterificação direta ou por transesterificação (ANSORGE-SCHUMACHER, 2013). A síntese industrial de ésteres cosméticos é realizada em alta temperatura usando um catalisador ácido ou básico, que requer altas temperaturas (150–240 °C) e pressões elevadas. Nessas condições o produto de interesse, gerado pela reação, não possui a qualidade desejada para ser diretamente aplicado nas formulações cosméticas, necessitando passar por processos de purificação para retirada de cor, fragrância e subprodutos gerados pela reação com catálise química. Visando superar essas desvantagens, o emprego da catálise enzimática é uma excelente alternativa, pois os métodos enzimáticos operam em baixas temperaturas (30–70 °C) e pressão ambiente, e ainda resultam na formação de um único produto. Além disso, os ésteres produzidos por biocatálise são considerados produtos naturais, satisfazendo as exigências dos mercados consumidores mais exigentes em termos de segurança ambiental (ANSORGE-SCHUMACHER, 2013; VEIT, 2004).

O éster de cera acetato de cetila é uma cera sólida à temperatura ambiente, e é amplamente utilizado como emoliente, condicionador da pele em cosméticos e em produtos de higiene pessoal e fragrância pela indústria cosmética. Pode ser encontrado em muitos tipos de cosméticos e produtos para cuidados pessoais, incluindo produtos para bebês, produtos de banho, produtos de limpeza, maquiagem para os olhos, produtos para cabelos e cuidados com a pele, bem como produtos para barbear (COSMETICS INFO, 2023).

É produzido naturalmente por insetos, plantas e alguns micro-organismos desempenhado um papel como feromônio. Esse éster recebe muitos nomes, sendo também conhecido como acetato de palmitila ou ainda acetato de 1-hexadecanol, mas pela IUPAC seu nome é acetato de hexadecila. Possui peso molecular de 284,5 g/mol.

Sua fórmula molecular é  $C_{18}H_{36}O_2$  e a Figura 9 representa a sua estrutura na forma bidimensional. Industrialmente, ele pode ser sintetizado por esterificação do álcool cetílico com o ácido acético glacial, na proporção de 1:1, para a obtenção do éster e água (COSMETICS INFO, 2023).

Figura 9 - Fórmula molecular do éster acetato de cetila



Fonte: Adaptado de PUBCHEM, 2022.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto de ferro (II) tetrahidratado ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), tetraetilortosilicato (TEOS), (3-aminopropil) trietoxilano (APTES), metanol, Coomassie Brilliant Blue G 250, glutaraldeído e p-NPB (p-nitrofenil butirato) foram adquiridos da Sigma Aldrich® (São Paulo, Brasil); ácido fosfórico 85% da Synth® (Diadema, Brasil); goma arábica em pó pura da Perfyl Tech® (São Paulo, Brasil); cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) foi adquirido da Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil); álcool cetílico da Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil); hidróxido de amônio e álcool isopropílico foram adquiridos da Isofar® (Rio de Janeiro, Brasil); azeite de oliva extra virgem Gomes da Costa®; peptona de caseína obtida da IONLAB® (Araucária, Brasil); nitrato de Sódio e acetona P.A. obtidos da Dinâmica® (São Paulo, Brasil); extrato de levedura obtido da Oxoid® (Basingstoke, Inglaterra); toluol P.A. ); ácido acético glacial e álcool etílico absoluto P.A. obtidos da Neon® (Suzano, Brasil). As lipases comerciais *Candida rugosa* (LCR), *Pseudomonas fluorescens* (LAK), de pâncreas suíno (LPP) foram procedentes da Novozymes® (Araucária-PR, Brasil);

Foram usados os seguintes equipamentos: balança analítica da Marte® (São Paulo, Brasil); banho ultratermostático da Cienlab® (Campinas, Brasil); reator de vidro com capacidade de 250 mL; agitador mecânico de alto torque Q250M da Quimis® (Diadema, Brasil); ímã de neodímio; incubadora *shaker* refrigerado SL 222/CRF e estufa de secagem e esterilização SL 100 da Solab® (Piracicaba, Brasil); liofilizador da Equipal® (Porto Alegre, Brasil); banho metabólico tipo dubnoff da Marconi® (Piracicaba, Brasil); espectrofotômetro IL-593-BI da IONLAB® (Araucária, Brasil) e banho ultrassônico 1400<sup>a</sup> da Unique® (Indaiatuba, Brasil).

#### 3.2 PRODUÇÃO DA LIPASE DE *GEOTRICHUM CANDIDUM*– LGC

A manutenção do *G. candidum* foi realizada em placas de Petri contendo ágar extrato de malte. (MEA). As placas foram mantidas a 4°C, permitindo seu armazenamento por até 15 dias. Antes do início do processo fermentativo, o fungo foi repicado em placas contendo ágar Sabouraud dextrose (SDA) e incubado a 28°C por

48 h para sua reativação. Após 48 h, uma quantidade pré-definida (diâmetro de 0,5 mm) do micro-organismo foi retirada da placa de SDA e transferida para um erlenmeyer de 1L, contendo 100 mL de inóculo, que era constituído de 2% (m/v) de peptona de caseína, 1% (v/v) de óleo de algodão, 0,1 % (m/v) de extrato de levedura e 0,05% (m/v) de MgSO<sub>4</sub> (CASTRO *et al.*, 2016).

O inóculo foi incubado por 24 h a 28 °C e agitação de 250 rpm em shaker. Em seguida, alíquotas de 10 mL do inóculo foram transferidas para erlenmeyers de 1L contendo 90 mL de meio de cultivo. O meio de cultivo era composto por 3% (m/v) de peptona de caseína, 1,5% (v/v) de óleo de algodão, 0,1 % (m/v) de extrato de levedura e 0,05% (m/v) de MgSO<sub>4</sub> (CASTRO *et al.*, 2016).

O meio de cultivo foi incubado em shaker a 28 °C, 250 rpm por 48 h. Ao final deste período, todos os caldos fermentativos foram filtrados à vácuo com papel de filtro, para a remoção das células e liofilizados até a redução de 1/3 do seu volume inicial, para posteriormente serem utilizados na etapa de imobilização enzimática (CASTRO *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018). Por meio deste método foi possível produzir exclusivamente a lipase do *G. candidum*, como descreve o trabalho desenvolvido por Castro *et al.* (2016), considerando a alta especificidade das enzimas produzidas pelo fungo de acordo com a fonte de carbono disponível no processo fermentativo.

### 3.3 SÍNTESE DAS SPIONs

As SPIONs foram sintetizadas por meio da coprecipitação do Ferro II e do Ferro III, seguindo o protocolo descrito por Franqui *et al.* (2015). Para isso, foram utilizados 80 mL de água deionizada aquecida a 80 °C sob fluxo constante de nitrogênio no reator. Em seguida, 15 mmol de FeCl<sub>3</sub> e 10 mmol de FeCl<sub>2</sub> foram adicionados e, posteriormente, 50 mL de NH<sub>4</sub>OH foram gotejados no sistema. A reação foi mantida por 30 minutos, sob agitação e fluxo de nitrogênio constantes.

Ao final da reação, as SPIONs passaram pela limpeza com água destilada até atingir o pH 7 e, em seguida, foram levadas à estufa por 24 horas, a 60 °C.

### 3.4 FUNCIONALIZAÇÃO COM TEOS

Para a funcionalização das SPIONs, obtidas pelo processo descrito anteriormente, foi aplicado TEOS (tetraortossilicato). Primeiramente, 1,2 g de nanopartículas foram dispersadas em uma solução de 120 mL de isopropanol:água destilada (5:1 v/v) e levadas ao sonificador por 20 minutos. Depois de transferir o conteúdo do sistema para o reator, foram adicionados 20 mL de  $\text{NH}_4\text{OH}$  e 8 mL de TEOS. A reação foi mantida por 12 horas em temperatura ambiente e agitação constante (FRANQUI *et al.*, 2015).

No final do processo, as nanopartículas magnéticas funcionalizadas com TEOS ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) foram lavadas com água destilada até que o meio atingisse a neutralidade. Por fim, as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  foram levadas à estufa nas mesmas condições da etapa anterior.

### 3.5 FUNCIONALIZAÇÃO COM APTES

As  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  passaram pela etapa de aminação da seguinte forma: 1 g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$  foi refluxado com 2 mL de APTES (3-aminopropil trietoxissilano) e 18 mL de tolueno por 4 horas, a 125 °C, em um sistema de refluxo fechado.

Após a reação ser finalizada, as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foram lavadas com acetona e água destilada até que o tolueno fosse removido. A secagem foi feita na estufa a 40 °C por 24 horas.

### 3.6 ATIVAÇÃO DO SUPORTE

Para a etapa de imobilização, o suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foi primeiramente ativado com glutaraldeído ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ ) seguindo a metodologia adaptada de Betancor *et al.* (2006) e de Vescovi *et al.* (2016). 1 g do suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  foi suspenso em 10 mL de solução de glutaraldeído a 0,2% (v/v), preparada em tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 7,0). A suspensão foi agitada por 1 h à temperatura ambiente, em seguida o suporte ativado foi recuperado e lavado com excesso de água destilada.

### 3.7 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES

A imobilização das lipases foi realizada utilizando-se o suporte previamente ativado com glutaraldeído. Foi utilizado 1 g do suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  em suspensão em 15 mL de uma solução enzimática preparada em tampão fosfato de sódio 10 mM (pH 7,0) contendo uma quantidade em mg de proteína, que variou de acordo com a finalidade do ensaio. Para os ensaios de carregamento foram utilizadas cargas de proteínas que variaram de 10 a 150 mg por g de suporte. Para os ensaios de caracterização foram utilizados 10 mg de proteína por g de suporte. A imobilização foi realizada durante 17 horas em shaker à temperatura ambiente e 200 rpm. Os derivados foram recuperados, lavados com água destilada e armazenados a 4°C para uso posterior (VESCOVI *et al.*, 2016; FERREIRA *et al.*, 2018).

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DO SUPORTE

As SPIONs e suas modificações foram submetidas a análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e análise de área de superfície (BET).

#### 3.8.1 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia das amostras foi analisada por MEV. Utilizou-se um microscópio Philips XL-30 FEG com canhão de emissão de elétrons por efeito de campo (FEG-SEM), trabalhando a 10 a 25 keV. O preparo das amostras foi realizado da seguinte forma: uma pequena quantidade de pó foi adicionada em eppendorf contendo 2 mL de isopropanol e foi colocada em banho de ultrassom por 10 minutos para desagregação das partículas. Com o auxílio de uma micropipeta, uma pequena gota da solução foi espalhada sobre o substrato de silício de área 5 mm x 5 mm colado no stub por uma fita dupla face de carbono. As amostras foram secas em estufa a 40°C por 12 horas.

#### 3.8.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Para a análise espectroscópica das amostras na região do infravermelho, foi utilizado um espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet (Modelo IS 50 FTIR) com acessório de refletância total horizontal atenuada (ATR) empregando cristal de

seleneto de zinco. O espectro foi obtido a partir de 64 varreduras na faixa de 4500–500  $\text{cm}^{-1}$  com resolução espectral de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.8.3 Análise de área de superfície (BET)

Para a análise da área superficial (BET) foi utilizando o equipamento Gemini VII versão 3.03 (modelo 2390 t). Foi empregado o nitrogênio gás como adsorvente, um tempo de equilíbrio de 10 segundos e a pressão relativa de 0,01 a 0,3.

## 3.9 PROPRIEDADES CATALÍTICAS DO SUPORTE

Para a determinação da influência do pH na atividade hidrolítica da LGC livre e imobilizada no suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ , variou-se o pH das soluções tampão entre 4 e 9. Os tampões utilizados foram carbonato de sódio (pH 9), fosfato de sódio (pH 6, 7 e 8) e acetato de sódio (pH 5 e 4), todos a 100 mM. Um carregamento de 10 mg de enzima imobilizada em 1 g de suporte foi usado para todos os ensaios.

O efeito da temperatura na atividade hidrolítica da LGC também foi avaliado, para o intervalo de 25 a 70°C tanto para a enzima livre, quanto para a imobilizada. As análises de atividade foram realizadas de acordo com o tópico 3.13-Determinação da atividade enzimática para a LGC.

## 3.10 ESTABILIDADE TÉRMICA

A determinação da estabilidade térmica a 40°C para a LGC imobilizada (26 mg em 1g de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{NH}_2$ ) foi realizada incubando-se 0,1 g de derivado em 1 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,0) em banho-maria (40°C) e 1 mL para a LGC livre nas mesmas condições. As amostras foram sendo retiradas ao longo do tempo e sua atividade hidrolítica foi determinada pela hidrólise do óleo de oliva em emulsão. (ver item 3.13 - Determinação da atividade enzimática para a LGC). O experimento prosseguiu com a retirada de amostras até que a atividade atingisse 50% da atividade relativa inicial (tempo de  $\frac{1}{2}$  vida).

Os dados obtidos foram usados para calcular a constante de desnaturação irreversível ( $k_d$ ) a partir do modelo de decaimento não-linear proposto por Sadana e Henley (1987), representado pela Equação 1.

$$\alpha = (1 - \alpha_1) \cdot \exp(-k_d \cdot t) + \alpha_1 \quad (1)$$

Em que:

$\alpha$  é a atividade residual (razão entre atividade medida e atividade inicial);

$\alpha_1$  é a razão entre a atividade específica inicial e final;

$t$  é o tempo de incubação;

$k_d$  é a constante de desnaturação irreversível para a enzima.

### 3.11 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

O derivado produzido (26 mg/g de suporte) foi aplicado na reação de esterificação para a síntese de acetato de cetila. Os ensaios foram realizados em frascos fechados utilizando-se 2,5 mL de substrato, preparados na proporção de 1:1 de ácido acético glacial:álcool cetílico (100 mM) em meio contendo n-hexano (MIGUEZ *et al.*, 2018).

A influência da concentração do derivado (3,05 a 12,95 % m/v) e da temperatura (25,86 a 54,14 °C) na síntese de acetato de cetila foram avaliadas por um DCCR 2<sup>2</sup> contendo três pontos centrais, totalizando 11 ensaios. Como variável resposta ao planejamento foi calculada a porcentagem de éster convertido ao final da reação sob agitação de 200 rpm. Os níveis utilizados no planejamento encontram-se descritos na Tabela 3.

Tabela 1 - Variáveis do DCCR 22 com seus respectivos níveis e valores reais

Variáveis	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
x <sub>1</sub> Conc. de derivado (% m/v)	3,05	4,50	8,00	11,50	12,95
x <sub>2</sub> Temperatura (°C)	25,86	30,00	40,00	50,00	54,14

Fonte: Autora (2023).

Após 60 min de reação, amostras contendo 0,2 mL foram retiradas (sem derivado) e transferidas para erlenmeyers contendo 10 mL de solução álcool-acetona

(1:1 v/v), 3 gotas de fenolftaleína e tituladas com solução de NaOH 20 mM, previamente padronizada.

Para o branco da reação foram realizados ensaios nas mesmas condições que os do planejamento, mas sem a adição do derivado. Os resultados foram analisados por meio do software Protimiza Experimental Design (2014) para ajuste de um modelo polinomial de segunda ordem, sendo utilizada a análise de variância (ANOVA) para estimar os parâmetros estatísticos e avaliar a construção da superfície de resposta e curva de contorno pelo modelo gerado.

O planejamento foi validado na melhor condição obtida (8,0 % m/v; 40 °C; 60 min), com a execução de um ensaio em triplicata. Ainda para esta condição, foi realizado o acompanhamento da reação de esterificação durante 7 h de reação.

### 3.12 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A síntese de acetato de cetila foi realizada sob as melhores condições experimentais; concentração de derivado de 8,0 (% m/v) e temperatura de 40 °C na proporção de 1:1 de ácido acético:álcool cetílico (100 mM) em meio contendo n-hexano, ao logo de 2 h de reação e agitação de 200 rpm. Foram utilizados seis ciclos sucessivos de 2 h cada um. Ao final de cada ciclo, o derivado foi retirado da mistura reacional por filtração e lavado com n-hexano para remover os reagentes ou as moléculas de produto retidas no microambiente do biocatalisador. Após esse procedimento o biocatalisador era reintroduzido em uma nova reação e assim sucessivamente até completar os seis ciclos.

### 3.13 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA AS ENZIMAS COMERCIAIS

A atividade das lipases de pâncreas de porco, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida rugosa* foi determinada utilizando-se o substrato sintético pNPB (p-nitrofenilbutirato), protocolo adaptado de Morais Jr. *et al.* (2016) e de Souza *et al.* (2021). Foram utilizados 2,5 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 e 25 mM, 50 µL da solução contendo a enzima livre ou imobilizada (para o branco foram utilizados 50 µL de água destilada) e 50 µL de pNPB. A reação de hidrólise de pNPB foi mantida por 5 min de reação, sob constante agitação e temperatura controlada.

Uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisou 1 mmol de p-NPB por minuto nas condições descritas anteriormente.

### 3.14 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PARA A LGC

A atividade hidrolítica da LGC foi determinada a partir da hidrólise do azeite de oliva de acordo com o método descrito por Ramos *et al.* (2015). O substrato foi preparado na proporção de 50% azeite de oliva e 50% água destilada (v/v), com adição de goma-arábica na proporção de 3,5% do volume total. O sistema foi preparado com 5 mL do substrato descrito acima e adição de 4,8 mL de tampão fosfato de sódio pH 7 (100mM) e 200 µL da solução contendo a enzima em sua forma livre. O branco foi realizado nas mesmas condições dos ensaios, utilizando o meio de produção da lipase previamente autoclavado. Para a LGC imobilizada, foi utilizado 0,1 g de derivado e 5 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7), sendo para o branco utilizados 5 mL de tampão fosfato e 0,1 g de suporte (ausência de lipase imobilizada).

A hidrólise foi mantida por 5 minutos, em shaker orbital a 37 °C, com agitação de 200 rpm. Para interromper a reação, foi utilizada uma solução de acetona e álcool na proporção de 1:1 (v/v). A atividade foi determinada por titulação dos ácidos graxos liberados na reação utilizando NaOH 20 mM e fenolftaleína como indicador (Equação 2). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 µmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições descritas do ensaio.

$$U_{Az} = \frac{(V_A - V_B) * 1000 * M_{NaOH}}{5 * A} \quad (2)$$

Em que:

VA – Volume de NaOH na padronização da amostra, em mL;

VB – Volume de NaOH na padronização do branco, em mL;

MNaOH – Molaridade do NaOH utilizado nas padronizações, em mol/L;

A – Volume ou massa de amostra utilizado no sistema, em mL ou g.

### 3.15 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA

A quantificação de proteína em todos os ensaios foi feita seguindo o protocolo estabelecido por Bradford (1976).

### 3.16 PARÂMETROS DE IMOBILIZAÇÃO

Os parâmetros de imobilização foram calculados de acordo com Ferreira *et al.* (2018). A atividade oferecida (AO) inicialmente, referente à enzima livre, foi calculada por meio da Equação 3:

$$AO = V * U_I \quad (3)$$

Em que:

V – Volume de enzima aplicada na imobilização, em mL;

$U_I$  – Atividade enzimática inicial, em U/mL.

O rendimento de imobilização (RI) foi calculado com base na quantificação de proteína, de acordo com a Equação 4:

$$RI_{Bradford} = \frac{MI-MS}{MI} * 100 \quad (4)$$

Em que:

MI – Quantidade de proteína ofertada inicialmente, em mg;

MS – Quantidade de proteína remanescente no sobrenadante, em mg.

A atividade recuperada (AR) foi calculada pela Equação 5:

$$AR = \frac{AD}{AO-AS} * 100 \quad (5)$$

Em que:

AD – Atividade do derivado, em U.

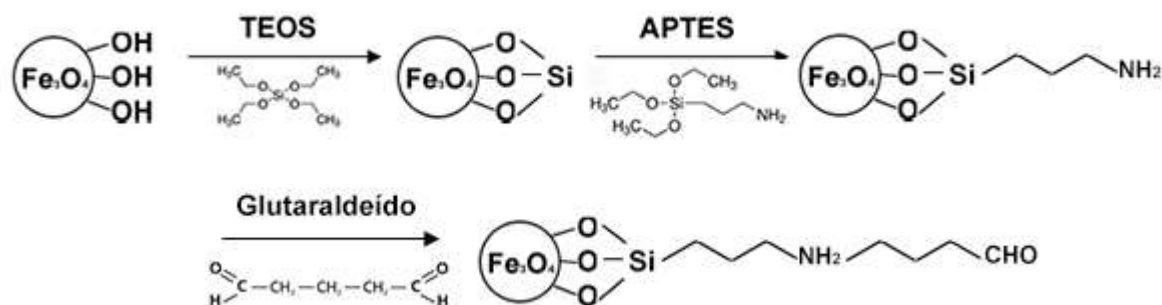
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

As propriedades físicas, químicas e a estrutura do suporte afetam significativamente a atividade, estabilidade, separação e recuperação da enzima imobilizada. A utilização das SPIONs como suporte possui vantagens tais como o pequeno tamanho das partículas, o que proporciona uma grande área de superfície para a imobilização e uma forte resposta magnética (SHUAI *et al.*, 2016). Entretanto, existem também alguns inconvenientes: geralmente as SPIONs tendem a se agregar devido à sua alta energia superficial desencadeada pela grande área superficial específica e ainda são facilmente oxidadas na presença de ar, levando à perda gradual de seu magnetismo, tornando a separação magnética menos eficaz (XU *et al.*, 2014; WU; HE; JIANG, 2008).

Nesse contexto, o revestimento da superfície das SPIONs com sílica pode auxiliar na prevenção da agregação e oxidação dessas partículas, protegendo assim os núcleos magnéticos. Ainda, a introdução de grupos silanol facilita a posterior funcionalização/modificação da superfície do suporte, no intuito de se introduzir outros grupamentos, tais como aminos ou epóxi que irão auxiliar no processo de imobilização de lipases (CHANG; TANG, 2014; TURAL *et al.*, 2013).

Assim, no presente trabalho, as SPIONs foram sintetizadas, funcionalizadas e utilizadas como suporte para a imobilização de lipases. Para atingir esse propósito, as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram primeiramente sintetizadas por coprecipitação e na sequência revestidas com TEOS formando as  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ . Posteriormente, estas nanopartículas foram tratadas com APTES, resultando na incorporação de grupos aminos à sua superfície ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$ ). Na próxima etapa, essas nanopartículas funcionalizadas com grupamentos amino, foram ativadas com glutaraldeído ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ ) para a imobilização por ligação covalente das lipases estudadas. A Figura 10 mostra uma representação esquemática das etapas realizadas para a modificação da superfície das SPIONs.

Figura 10 - Esquema das etapas envolvidas na modificação da superfície das SPIONs



Fonte: Autora (2023).

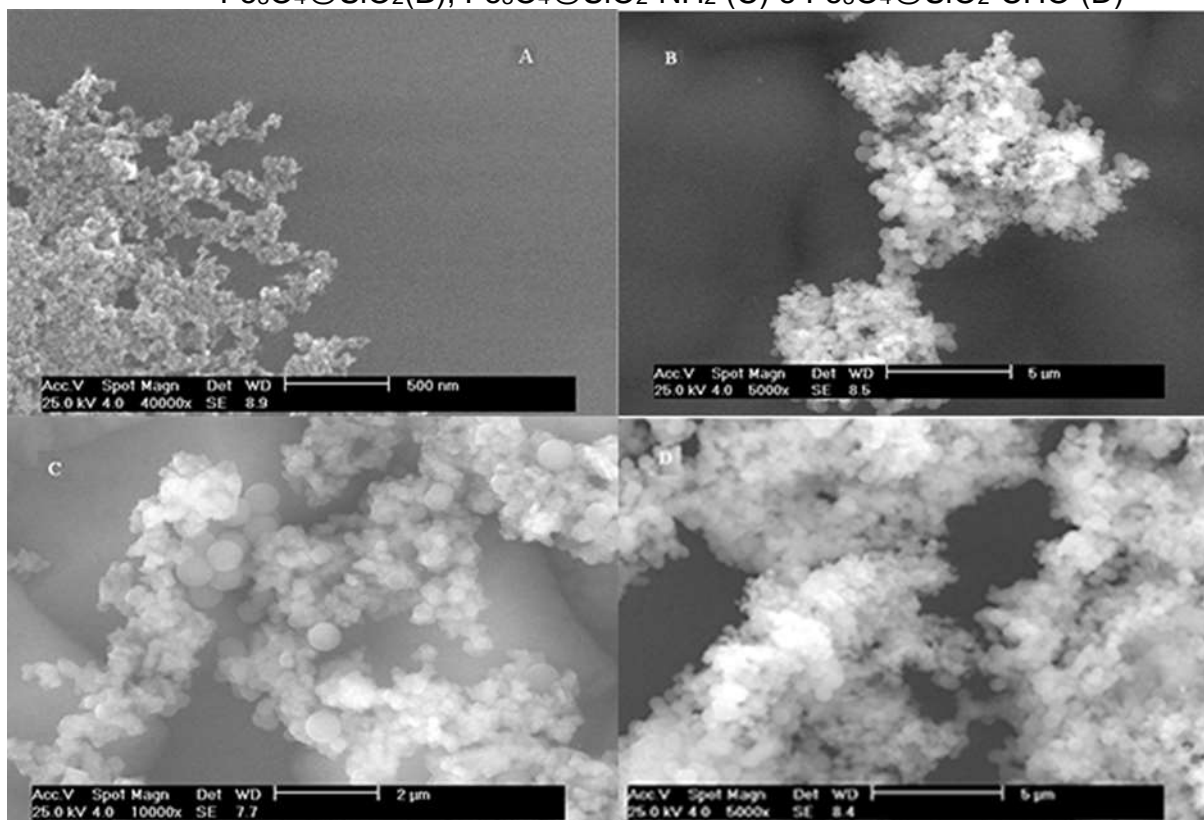
#### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

A caracterização permite analisar corretamente as propriedades de um material. É na morfologia das nanopartículas que muitas informações podem ser obtidas. A conformação do material pode elucidar propriedades relevantes e, para a escala nanométrica, as técnicas de microscopia como a de luz polarizada, eletrônica de transmissão (MET) e eletrônica de varredura (MEV) são muito aplicadas (KHAN; SAEED; KHAN, 2017).

Com o uso da técnica da difração eletrônica, na qual se baseia a MEV, é possível analisar a estrutura cristalográfica das nanopartículas, já que os aparelhos funcionam com a dedução da forma de um sólido analisado a partir do padrão de difração de elétrons, cujo comprimento de onda é previamente determinado (MOURDIKOURDIS; PALLARES; THANH, 2018)

Assim, as nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub> e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>-CHO foram analisadas por MEV e se encontram na Figura 11.

Figura 11 - Microscopia eletrônica de varredura dos materiais  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (A),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ (B),  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  (C) e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  (D)



Fonte: Autora (2023).

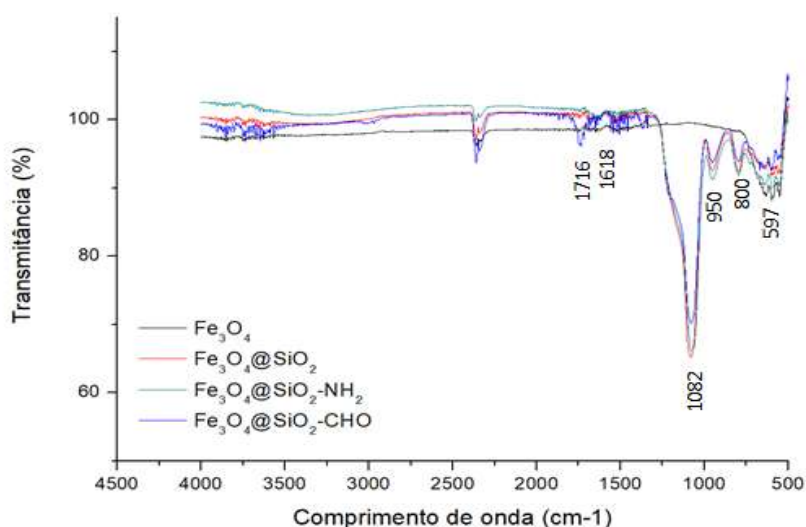
Observa-se que as partículas sintetizadas  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Fig. 11 A), são de tamanho nanométrico, uniformes e menores que 100 nm, podendo ser denominadas nanopartículas, embora elas se encontrem um pouco agregadas na microscopia, provavelmente devido à sua alta energia superficial. O recobrimento das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com sílica ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ) está bem visível na microscopia (Fig. 11 B), onde as esferas englobando as nanopartículas representam a sílica. Nas microscopias (C) e (D) da Fig. 11 têm-se as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ , respectivamente. É possível observar que a ativação do suporte com glutaraldeído (Fig. 11 D) promoveu uma maior agregação das nanopartículas quando comparado ao suporte apenas aminado (Fig. 11 C), o que pode ser justificado pela utilização do agente bifuncional (glutaraldeído) cuja função é realmente a de promover o entrecruzamento entre as partículas.

A partir dos resultados da análise de FTIR, foi possível determinar a presença dos ligantes, e a composição tanto da superfície quanto do interior das nanopartículas. A técnica se baseia na leitura do espectro produzido quando uma molécula absorve

radiação eletromagnética dentro do infravermelho. Os picos presentes no espectro revelam informações sobre a presença de grupos funcionais e a natureza da ligação dessas moléculas, sendo assim possível determinar a estrutura correta da nanopartícula (MOURDIKOU DIS; PALLARES; THANH, 2018).

As nanopartículas magnéticas preparadas foram analisadas no intuito de se verificar se as etapas de revestimento com sílica, aminação e ativação com glutaraldeído haviam sido conduzidas com sucesso. Os espectros de infravermelho das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  estão representados na Figura 12. Os picos de absorção característicos das vibrações de estiramento de Fe-O, Si-O, Si-OH, Si-O-Si, C=O foram detectados respectivamente em  $597\text{ cm}^{-1}$ ,  $800\text{ cm}^{-1}$ ,  $950\text{ cm}^{-1}$ ,  $1082\text{ cm}^{-1}$ ,  $1618\text{ cm}^{-1}$  e  $1716\text{ cm}^{-1}$ . As vibrações dos estiramentos obtidas estão de acordo com as reportadas em literatura, onde a ligação de Fe-O para a  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram detectadas a  $600\text{ cm}^{-1}$  por Hadadi e Habibi (2019). Putz e Putz (2012) e Wang *et al.* (2012) descreveram que na região entre  $800$  e  $1100\text{ cm}^{-1}$  apareceram as bandas referente às ligações Si-O, Si-OH, sendo a mais intensa a de deformação assimétrica das ligações Si-O-Si. As bandas referentes as ligações N-H, indicando que houve a aminação do suporte e as referentes a C=O (carbonila presente nos grupamentos aldeídos do glutaraldeído, estão de acordo com os reportados por Cao *et al.* (2021), que preparou um suporte com os mesmos agentes modificadores, confirmando assim que o suporte neste trabalho foi preparado com sucesso.

Figura 12 - Espectros de FTIR para as nanopartículas preparadas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-NH}_2$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ .



Fonte: Autora (2023).

Para auxiliar na caracterização, os resultados obtidos por meio do BET estão demonstrados na Tabela 4, que apresenta os valores de área superficial, volume e tamanho do poro de cada material sintetizado.

Tabela 2 - Valores de área superficial, volume e tamanho de poro dos materiais sintetizados

Materiais	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Volume do poro (cm <sup>3</sup> /g)	Tamanho do poro (Å)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	73,563	0,119905	65,199
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	7,1720	0,014211	79,258
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -NH <sub>2</sub>	9,5360	0,017159	71,980
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> -CHO	7,1800	0,011778	65,618

Fonte: Autora (2023).

Observou-se que a área superficial sofreu uma diminuição mais pronunciada com o recobrimento das partículas magnéticas de ferro por sílica (de 73,563 para 7,1720 m<sup>2</sup>/g) estando de acordo com o que foi observado pela análise de MEV. Os outros tratamentos praticamente não modificaram a área superficial da partícula.

Os valores de tamanho de poro são bem próximos para todos os materiais, exceto para o suporte revestido com sílica (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>), que foi o maior valor observado (79,258 Å), e provavelmente isso se deva a formação de camadas entre a superfície da partícula de ferro e o revestimento. Já o volume do poro, diminuiu com o aumento dos tratamentos realizados. Este resultado pode ser explicado pela característica de cada superfície a ser analisada. Ao ocorrer o recobrimento com sílica e sucessivamente as outras modificações, as partículas sofrem cada vez mais interações entre si, reduzindo assim o seu espaçamento, culminando com a ativação por glutaraldeído que é realmente um agente bifuncional que promove a formação de ligações cruzadas intermoleculares entre as moléculas da superfície da lipase e o suporte, ou entre as próprias lipases, obstruindo parte do poro e assim diminuindo seu volume e área superficial.

## 4.2 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DE DIFERENTES LIPASES NO SUPORTE SINTETIZADO

A carga enzimática máxima que um suporte pode atingir remete a benefícios para sua aplicação industrial, já que uma operação com atributos máximos traz maiores produtividades. Porém, é preciso relacionar a carga enzimática com valores de atividade, pois, quando o suporte atinge sua saturação, a capacidade catalítica da enzima pode decair, devido a problemas difusionais, dificultando a conversão do substrato (FERREIRA, 2017).

As lipases comerciais de pâncreas de porco (LPP), *Pseudomonas fluorescens* (LAK) e *Candida rugosa* (LCR) foram imobilizadas no suporte magnético sintetizado e modificado com sílica e funcionalizado com um grupo amina e ativado com glutaraldeído ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ ) e comparadas com a lipase de *Geotrichum candidum* (LGC) Esta foi produzida por fermentação submersa no presente trabalho e imobilizada nas mesmas condições das lipases comerciais. Na Tabela 5 estão mostrados seus respectivos parâmetros de imobilização.

Tabela 3 - Comparativo dos parâmetros relativos à imobilização das lipases de diferentes fontes no suporte sintetizado

Enzima	Carregamento de proteína (mg/g de suporte)	AO (U)	RI (%)	PI (mg/ g de suporte)	AD (U/ g de suporte)	AR (%)
LGC	10	309,2 ± 0,3	69,4	6,9	39,1 ± 0,1	18,2
	50	923,9 ± 0,7	52,1	26,0	54,4 ± 0,2	17,0
	150	2992,2 ± 1,4	30,8	46,1	28,1 ± 0,2	3,1
LPP	10	47,4 ± 0,1	92,6	9,3	0,6 ± 0,1	1,3
	50	319,7 ± 0,1	82,8	41,4	0,7 ± 0,1	0,3
	150	697,5 ± 0,2	68,6	102,9	1,5 ± 0,3	0,3
LAK	10	256,3 ± 0,1	20,9	2,1	19,8 ± 0,1	37,0
	50	1624,1 ± 0,1	7,7	3,9	78,8 ± 0,7	63,0
	150	40006,6 ± 0,2	3,3	5,0	1.222,01 ± 0,1	92,6
LCR	10	2634,5 ± 0,1	54,2	5,4	78,8 ± 0,1	5,5
	50	21729,6 ± 7,6	46,9	23,4	1400,0 ± 0,4	14,0
	150	67186,1 ± 5,3	39,1	58,6	5.963,2 ± 0,1	22,7

Fonte: Autora (2023).

Nota: AO = atividade oferecida; RI = rendimento de imobilização; PI = proteína imobilizada; AD = atividade do derivado, AR = atividade recuperada.

Para a LGC verificou-se que o rendimento de imobilização decaiu com um aumento da quantidade inicial de proteína, mas a saturação do suporte não foi atingida, pois a quantidade de proteína imobilizada aumentou com o aumento da quantidade de lipase oferecida. Entretanto, a melhor atividade do derivado ( $54,4 \pm 0,2$  U/ g de suporte) foi obtida para a imobilização de 26 mg de proteína por g de suporte, sendo que para o maior valor de proteína imobilizada ( $46,1$  mg/ g de suporte) a atividade do derivado caiu para  $28,1 \pm 0,2$  U/ g de suporte. Esse comportamento provavelmente é devido a problemas de limitações difusionais. Uma vez que a LGC possui um diâmetro molecular de  $69,5$  Å, como demonstra Schrag *et al.* (1991), e assim sua imobilização ocorreu totalmente na superfície do suporte utilizado, é presumível que uma maior quantidade de proteína imobilizada em uma mesma área superficial, possa promover uma menor acessibilidade de substratos grandes como os triacilglicerídeos (óleo de oliva) aos sítios ativos enzimáticos. O valor de atividade recuperada encontrada para esses ensaios reforça a hipótese de problemas difusionais do substrato.

Ferreira *et al.* (2018) imobilizou a LGC em um suporte de octil-agarose por ligação covalente com glioxil. A ligação covalente da LGC foi realizada por incubação em meio alcalino (pH 9), obtendo-se um rendimento de imobilização de  $30,04 \pm 0,02$  % e atividade do derivado de  $6,40 \pm 0,39$  U/g de suporte. Os autores atribuíram o baixo valor de atividade hidrolítica encontrado devido a necessidade de incubação da LGC em meio alcalino, para a formação das ligações covalentes entre a lipase e o suporte, o que levou a sua inativação. Comparando-se esse resultado com o obtido neste trabalho, observa-se que a imobilização por ligação covalente da LGC utilizando-se glutaraldeído propiciou a obtenção de um derivado com maior atividade hidrolítica, pois na metodologia empregada a incubação da enzima com o suporte nanomagnético ocorre no pH neutro, no qual a LGC mantém sua conformação estrutural.

Para a LPP, foi observado um alto rendimento de imobilização – que se manteve acima dos 60% em todos os ensaios – demonstrando também que o suporte não atingiu a saturação, pois a quantidade de proteína imobilizada continuou a aumentar com o aumento do carregamento, de  $9,26$  a  $102,92$  mg/ g de suporte. Entretanto, uma maior imobilização não se traduziu numa alta atividade recuperada, pois o derivado quase não expressou atividade hidrolítica. A LPP possui um diâmetro molecular de  $59,92$  Å e assim a sua imobilização também ocorreu totalmente na superfície do suporte (VAN TILBURGH, 1992). Uma possível explicação para esse

resultado seria que a utilização do glutaraldeído para a formação da ligação covalente, resultou em uma condição drástica para PPL, levando a alteração de sua conformação e conseqüentemente a sua inativação (SHAO *et al.*, 2015). É bem conhecido que a imobilização utilizando glutaraldeído implica na modificação química da superfície da lipase, pois ele é um agente bifuncional que estabelece ligações entre os grupos amina primários contidos no suporte e os resíduos de lisina presentes na superfície da enzima (MIGNEAULT *et al.*, 2004).

É bastante reportado na literatura que lipases diferentes podem apresentar comportamentos distintos quando submetidas à imobilização com glutaraldeído. Há outros fatores que influenciam no processo de imobilização como o tempo de entrecruzamento, a concentração de glutaraldeído e ainda o tipo de modificações resultante na superfície da enzima, que podem levar a uma perda na atividade recuperada (MATEO *et al.*, 2004).

Quando comparada a LGC e a LPP, a LAK apresentou um rendimento de imobilização mais baixo, mesmo quando foram usadas maiores quantidades de proteína. Assim, o total de proteína imobilizada no suporte ficou restrito a uma faixa entre 2,09 a 4,95 mg/ g de suporte para todos os carregamentos empregados, entretanto, todos os derivados apresentaram uma atividade hidrolítica, que aumentou com o aumento da quantidade de proteína imobilizada, resultando em um aumento da atividade recuperada. Aqui também a imobilização ocorreu na superfície do suporte, pois o diâmetro molecular da LAK é de 69,78 Å (NARDINI *et al.*, 2000).

A LCR obteve parâmetros de rendimento de imobilização que indicaram que o suporte não atingiu a saturação com as cargas enzimáticas ofertadas nos ensaios. Entretanto, a atividade recuperada para todos os ensaios aumentou com o aumento da quantidade de proteína imobilizada. O comportamento da LCR na imobilização em suporte nanomagnético ativado com glutaraldeído ( $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ ) foi muito promissor, indicando que esta lipase manteve sua atividade catalítica mesmo com uma maior rigidificação (ligação covalente).

Os resultados encontrados para a LCR estão de acordo com os reportados por Adnan *et al.*, (2020) que imobilizaram a mesma enzima em SPIONs modificadas com APTES sendo também ativadas com glutaraldeído. Os autores encontram uma hiperativação da lipase, que correspondeu 13 vezes ao valor do encontrado para a enzima livre.

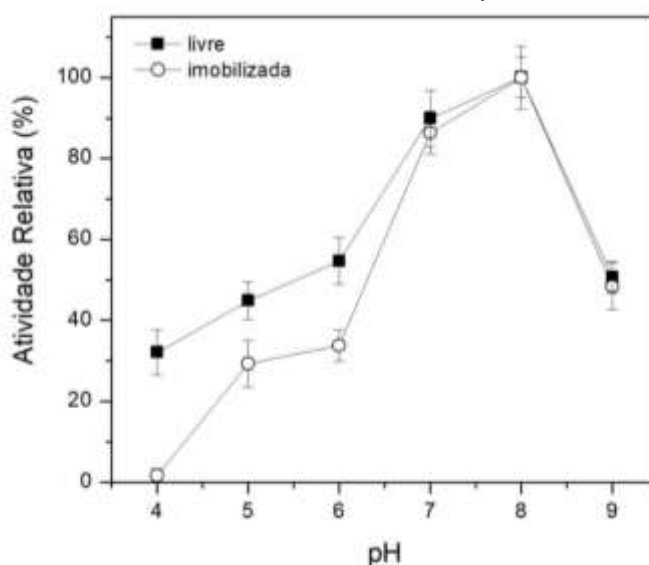
### 4.3 EFEITOS DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática está ligada à manutenção da estrutura das enzimas. Sabe-se que a variação dos valores de pH em um meio, assim como a temperatura na qual as enzimas são expostas, influenciam nas ligações de hidrogênio, ligações essas que interpretam um papel importante na conformação de uma proteína, sendo responsáveis pela estrutura secundária que, ao sofrer alterações, desencadeia um processo que resulta na desnaturação da enzima, impedindo que ela cumpra seu papel catalítico (NELSON; COX; LEHNINGER, 2017).

A desnaturação pode ser percebida na alteração repentina na atividade enzimática. O biocatalisador geralmente atinge seu pico de atividade em uma faixa ótima, tanto de valores de pH, quanto de temperatura, porém, quando o meio de reação se distancia desses valores ótimos, apenas uma pequena alteração em uma região da enzima será capaz de desencadear o processo que leva à desnaturação (NELSON; COX; LEHNINGER, 2017).

O efeito do pH na atividade hidrolítica da LGC livre e imobilizada foi determinado pela hidrólise do óleo de oliva em emulsão para o intervalo de pH variando de 4 a 9 (Figura 13).

Figura 13 - Comparação das atividades relativas obtidas para diferentes valores de pH entre a LGC livre e imobilizada.



Fonte: Autora (2023).

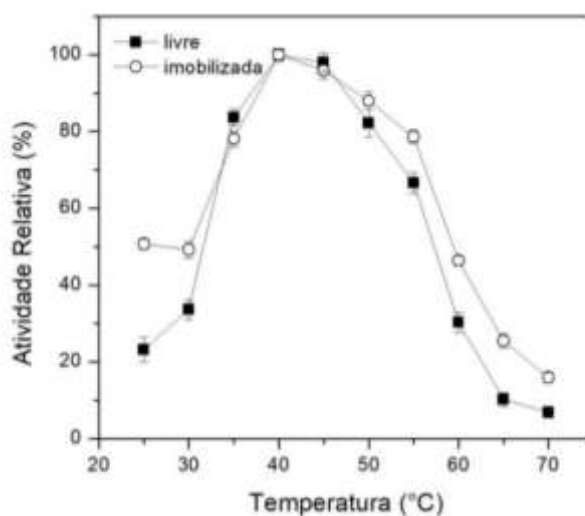
Dentre os valores de pH avaliados, tanto a LGC imobilizada quanto a livre apresentaram uma maior atividade hidrolítica para o pH 8. Para a LGC livre, 100% de

atividade relativa correspondeu a  $18,2 \pm 3,1$  U/mL e para a LGC imobilizada a atividade correspondente foi de  $44,0 \pm 2,9$  U/g de suporte. Na região de pH ácido, a LGC livre reteve uma maior porcentagem de atividade do que a lipase imobilizada. Uma possível explicação para esse resultado, seria que as alterações sofridas pela superfície do suporte em pH ácido, poderiam alterar a conformação da lipase imobilizada na superfície do suporte, levando a uma menor atividade catalítica da LGC imobilizada em relação a lipase livre.

O efeito da temperatura de reação na atividade hidrolítica da LGC livre e imobilizada foi determinado para a faixa de 25 a 70°C (Figura 14). A máxima atividade hidrolítica relativa foi observada para a temperatura de 40°C, tanto para a LGC livre quanto para a imobilizada. As atividades correspondentes para a LGC livre e imobilizada a 40 °C foram de  $17,87 \pm 1,4$  e  $39,6 \pm 2,7$  U/mL, respectivamente.

Os resultados demonstraram que a ligação covalente mediada pelo glutaraldeído ao suporte não alterou a conformação da LGC e está de acordo com os resultados encontrados por Hou e Zhu (2015), que imobilizaram a LCR em um suporte de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> modificado com polietilenimina (PEI) e ativado com glutaraldeído. Os autores relataram que foram observadas diferenças mínimas entre a LCR livre e imobilizada para as condições ótimas de pH e temperatura.

Figura 14 - Comparação das atividades relativas entre a LGC livre e imobilizada em SPION em diferentes temperaturas.



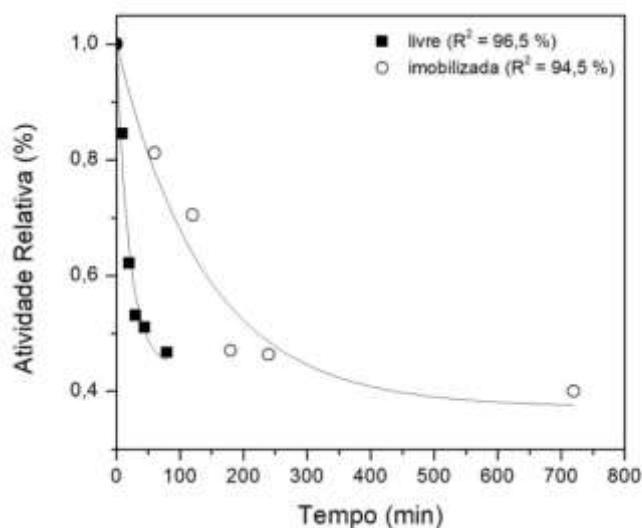
Fonte: Autora (2023).

#### 4.4 ESTABILIDADE TÉRMICA

O ensaio de estabilidade térmica da LGC imobilizada permitiu identificar o tempo de meia vida ( $t^{1/2}$ ), parâmetro que remete ao tempo necessário para que a atividade da enzima atinja 50% do valor inicial. Um  $t^{1/2}$  mais elevado demonstra que a enzima é capaz de se manter ativa por mais tempo na temperatura analisada (SOUZA *et al.*, 2015). A constante de desnaturação irreversível ( $k_d$ ) também foi calculada, e esse valor se relaciona com o  $t^{1/2}$  de forma inversamente proporcional, permitindo determinar que, quanto menor o  $k_d$ , maior a estabilidade da enzima, já que a tendência a desnaturação diminui (PACHECO; MENDES, 2021).

A Figura 15 mostra o comportamento das enzimas livre e imobilizada ao serem submetidas à incubação na temperatura de 40°C. O gráfico indicou que a imobilização foi capaz de garantir uma maior proteção da conformação enzimática nas condições avaliadas, resultando em um maior tempo de meia-vida para a LGC imobilizada. O tempo de meia vida para a enzima livre foi de 46 min e de 223 min para a LGC imobilizada, indicando um aumento de aproximadamente 4,8 vezes no  $t^{1/2}$  para a enzima imobilizada. Os valores da constante de desnaturação irreversível ( $k_d$ ), obtidos para LGC livre e imobilizada foram de 0,4999 e 0,00716  $\text{min}^{-1}$ , respectivamente, indicando que a imobilização promoveu uma maior estabilidade térmica para a LGC.

Figura 15 - Gráfico de inativação térmica da LGC imobilizada.



Fonte: Autora (2023).

#### 4.5 REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

A LGC imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  foi utilizada na síntese do éster cosmético acetato de cetila. A influência da concentração do derivado (3,05 a 12,95 % m/v) e da temperatura (25,86 a 54,14 °C) na síntese do éster foram avaliadas por um DCCR 2<sup>2</sup>. Na Tabela 6, estão descritos os resultados obtidos nos ensaios realizados ao final de 60 min de reação.

Tabela 4 - Matriz do DCCR 22 para a determinação da conversão obtida para o acetato de cetila após 60 min de reação

Ensaio	Variáveis Independentes		Resposta		
	Conc. de derivado (% m/v)	Temperatura (°C)	Conversão (%)	Valor Predito (%)	Desvio (%)
1	-1 (4,5)	-1 (30)	16,60	16,25	2,11
2	+1 (11,5)	-1 (30)	22,99	21,19	7,83
3	-1 (4,5)	+1 (50)	17,75	16,25	8,45
4	+1 (11,5)	+1 (50)	19,16	21,19	-10,59
5	-1,41 (3,0)	0 (40)	12,25	13,46	-9,84
6	+1,41 (13,0)	0 (40)	20,69	20,42	1,30
7	0 (8,0)	-1,41 (26)	16,60	20,60	-24,08
8	0 (8,0)	+1,41 (54)	23,72	20,60	13,17
9	0 (8,0)	0 (40)	27,67	26,72	3,43
10	0 (8,0)	0 (40)	26,50	26,72	-0,83
11	0 (8,0)	0 (40)	26,00	26,72	-2,77

Fonte: Autora (2023).

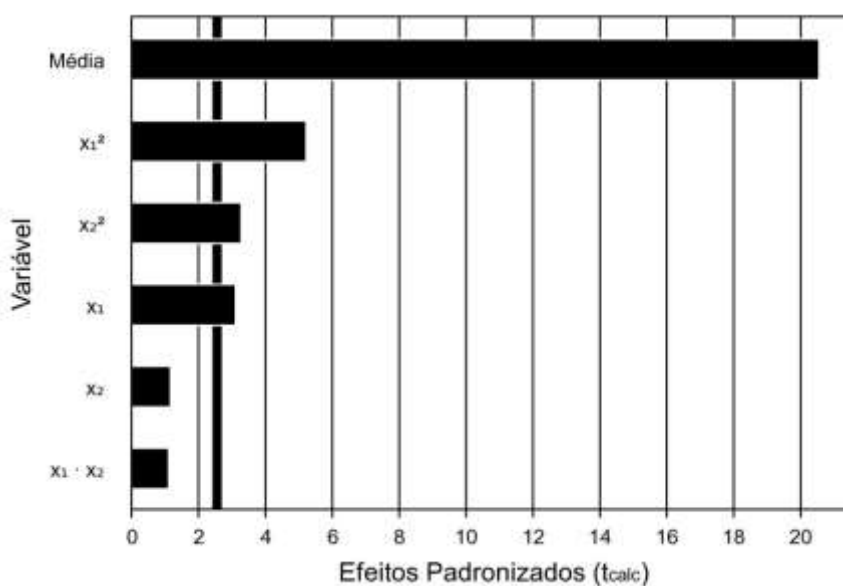
Os resultados mostraram que as melhores taxas de conversão foram obtidas para as condições utilizadas nos pontos centrais (8% m/v e 40°C). A análise estatística (Tabela 7) mostrou que os termos linear e quadrático para a concentração de derivado ( $x_1$ ) e o termo quadrático para a temperatura ( $x_2^2$ ) foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de significância, ou seja,  $p < 0,05$ . O diagrama de Pareto (Fig. 16) também indica as variáveis que foram estatisticamente significativas no planejamento realizado a 5% de significância.

Tabela 5 - Coeficientes de regressão obtidos para DCCR 22, utilizando-se 5% de nível de significância

Variáveis	Coeficientes	Erro padrão	$p$ -valores
Média	26,72	1,30	0,0000
$x_1$	2,47	0,79	0,0267
$x_1^2$	-4,92	0,95	0,0034
$x_2$	0,92	0,79	0,2974
$x_2^2$	-3,08	0,95	0,0225
$x_1 x_2$	-1,24	1,12	0,3182

Fonte: Autora (2023).

Figura 16 - Diagrama de Pareto para as variáveis independentes, concentração de derivado e temperatura



Fonte: Autora (2023).

Os coeficientes não significativos foram retirados do modelo e lançados nos resíduos e assim, os coeficientes de regressão foram novamente recalculados e utilizados para gerar a Eq. (6). Os novos coeficientes gerados estão mostrados na Tabela 8.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão significativos, erro padrão e p-valores para a conversão de acetato de cetila obtida, utilizando 5% de nível de significância

Variáveis	Coeficientes	Erro padrão	p-valores
Média	26,72	1,32	0,0000
$x_1$	2,47	0,83	0,0204
$x_1^2$	-4,92	0,98	0,0016
$x_2^2$	-3,08	0,98	0,0016

Fonte: Autora (2023).

$$\text{Conversão (\%)} = 26,72 + 2,47x_1 - 4,92x_1^2 - 3,08x_2^2 \quad (6)$$

A Tabela 9 mostra a ANOVA gerada somente para coeficientes estatisticamente significativos (Tabela 9), na qual observou-se que o valor de  $F_{\text{calc}}$  (12,3) foi maior do que o valor do  $F_{\text{tab}}$  (4,35) e que o coeficiente de determinação obtido foi bom (0,84). Verificou-se que a maior porcentagem dos resíduos observados está vinculada à falta de ajuste do modelo aos dados experimentais (36,80), pois o valor do erro puro obtido foi baixo (1,50), indicando assim que os ensaios são reproduzíveis e os experimentos estão sob controle. Ainda, a maioria dos valores previstos possui desvios abaixo de 10% (ver Tabela 7) e, portanto, a superfície de resposta e curva de contorno (Figuras 17 e 18, respectivamente) pôde ser construída para análise dos resultados.

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para o modelo somente com os parâmetros significativos, utilizando-se 5% de nível de significância

Fonte de Variação	Coeficientes	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F-calculado	p-valor
Regressão	202,10	3	67,40	12,30	0,00351
Residual	38,30	7	5,50		
Falta de Ajuste	36,80				
Erro puro	1,50				
Total	240,30	10			

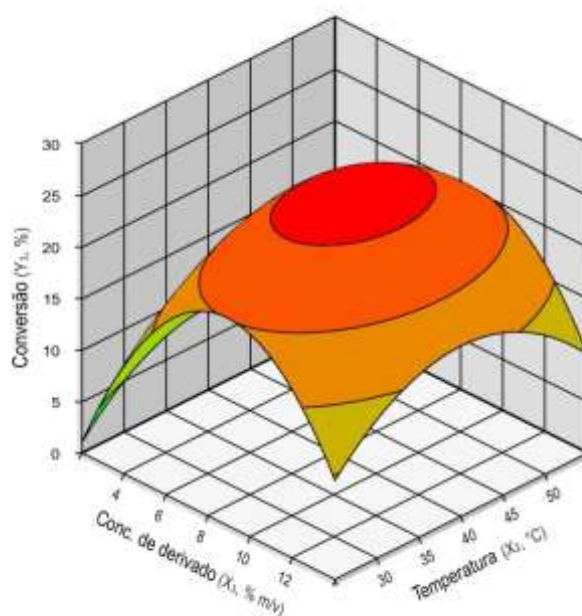
Coeficiente de determinação:  $R^2 = 0,84$

$F_{3;7;0.05} = 4,35$

Fonte: Autora (2023).

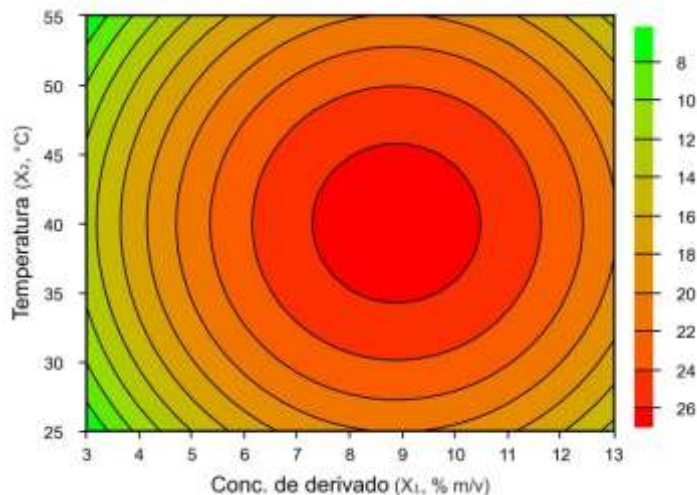
Na Figura 17, observa-se uma região ótima de conversão de acetato de cetila a partir das variáveis estudadas e, com o auxílio da Figura 18, notou-se que essa região permite uma operação com menor rigor no controle de temperatura e concentração de enzima, sendo mantida a máxima conversão nas faixas que compreendem, aproximadamente, a temperatura dos 35 aos 45°C e a concentração de derivado de 7,5 a 10,5 % m/v. Essa amplitude nos parâmetros operacionais ótimos unido ao fato de que estes parâmetros não possuem valores extremos, tornam a aplicação industrial da LGC imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  muito interessante no ponto de vista econômico, pois não houve o emprego de altas temperaturas e nem maior quantidade de derivado para a obtenção da máxima conversão obtida.

Figura 17 - Superfície de resposta para a conversão obtida de acetato de cetila em função da variação da concentração de derivado e temperatura, catalisada pela LGC imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$



Fonte: Autora (2023).

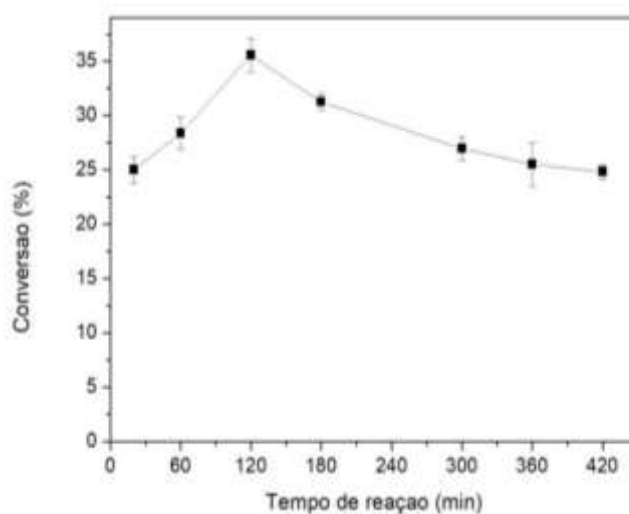
Figura 18 - Curva de contorno para a conversão obtida de acetato de cetila em função da variação da concentração de derivado e temperatura, catalisada pela LGC imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$



Fonte: Autora (2023).

Para a validação do DCCR foi selecionada a condição do ponto central, na qual a temperatura era de 40°C e a concentração de derivado de 8,0 % m/v. A reação foi acompanhada por 420 min. Os ensaios foram realizados em duplicata e a Figura 19 mostra o perfil da síntese do acetato de cetila ao longo dos 420 min de reação.

Figura 19 - Efeito do tempo de reação para a conversão de acetato de cetila catalisada pela LGC imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$  ao longo de 420 min.



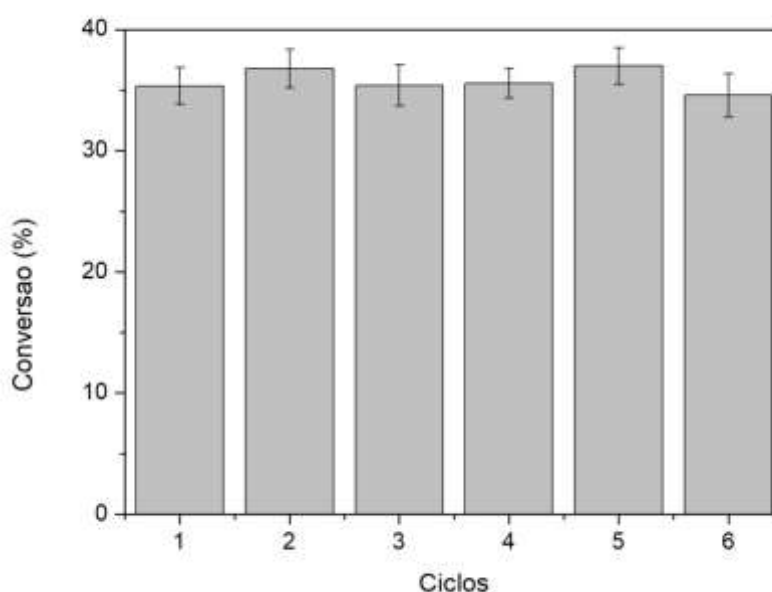
Fonte: Autora (2023).

A máxima conversão obtida foi de  $35,56 \pm 1,56$  % m/v para o tempo de 120 min de reação. É possível verificar que com o aumento do tempo de reação, acima de 120 min, a conversão do éster diminuiu. Uma vez que a reação de esterificação é reversível, é possível que a formação de água juntamente com o produto atue deslocando o equilíbrio da reação para a hidrólise, justificando o comportamento observado.

#### 4.5 ESTABILIDADE OPERACIONAL

A reutilização do biocatalisador impacta diretamente sobre a viabilidade econômica do processo enzimático, pois favorece a redução de custo do biocatalisador, sendo um fator muito importante a ser considerado (HILLS *et al.*, 2003). Neste estudo, os ensaios de reutilização foram realizados nas condições experimentais ótimas após 6 sucessivos ciclos de reação de 2 h cada. De acordo com os resultados apresentados na Figura 20, o derivado manteve a sua atividade inicial após seis ciclos sucessivos. Este resultado é devido a uma boa imobilização das moléculas de LGC com a superfície do suporte pela ligação covalente, que proporcionou sua estabilidade e impediu a sua dessorção.

Figura 20 - Estabilidade operacional do derivado após sucessivos ciclos de 2 h cada para a síntese de acetato de cetila.



Fonte: Autora (2023).

Estes resultados demonstram que o derivado preparado pôde ser utilizado com sucesso na síntese enzimática do éster cosmético, contribuindo para a área de biocatálise enzimática na busca por processos mais sustentáveis e não agressivos ao meio ambiente e ainda economicamente atrativo, pois foi utilizado um suporte magnético que permitiu a fácil recuperação da lipase, esta última produzida por um cultivo submerso de baixo custo (CASTRO *et al.*, 2016).

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos foi possível concluir que a produção e modificação da superfície das SPIONs foi bem sucedida, obtendo-se partículas que puderam ser utilizadas como suporte na imobilização por ligação covalente da lipase de *G. candidum*, produzida por cultivo submerso. Além disso, o suporte sintetizado também foi aplicado para a imobilização enzimática de diferentes lipases e os resultados demonstraram potencial para futuros estudos, principalmente na imobilização da lipase comercial de *Candida rugosa*.

A LGC por sua vez, ao ser imobilizada em  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2\text{-CHO}$ , obteve melhorias contundentes quanto ao tempo de meia vida e  $k_d$ , aumentando sua estabilidade térmica e ainda mantendo suas propriedades catalíticas para temperatura (40 °C) e pH (8) ótimos, indicando que a imobilização não gerou mudanças que afetassem essas propriedades da lipase.

Ainda a LGC imobilizada demonstrou ser eficaz para a produção de éster de cera de acetato de cetila por esterificação, atingindo uma máxima conversão de  $35,56 \pm 1,56$  % m/v após 120 min de reação. Os ensaios de estabilidade operacional confirmaram que a estabilidade da LGC foi alcançada pela imobilização covalente, pois o derivado manteve praticamente toda a sua atividade inicial mesmo após ser reutilizado em 6 ciclos consecutivos de reação de 120 min cada um.

## REFERÊNCIAS

- ABDULMALEK, S. A.; YAN, Y. Recent developments of lipase immobilization technology and application of immobilized lipase mixtures for biodiesel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 16, n. 4, p. 1062-1094, June 2022.
- ADNAN, M. *et al.* Enhanced biological activity of *Candida rugosa* lipase via immobilization on magnetic nanoparticles. **Egyptian Journal of Chemistry**, Apr. 2020.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475-6490, July 2013.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes: A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, Dec. 2019.
- BETANCOR, L. *et al.* Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 877-882, Aug. 2006.
- BILAL, M. *et al.* Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530-2544, Dec. 2018.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, May 1976.
- CAIZER, C.; RAI, M. (Ed.). **Magnetic nanoparticles in human health and medicine: current medical applications and alternative therapy of cancer**. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2021.
- CAO, X. *et al.* One-step direct transesterification of wet yeast for biodiesel production catalyzed by magnetic nanoparticle-immobilized lipase. **Renewable Energy**, v. 171, p. 11-21, June 2021.
- CARRIAZO BAÑOS, J. G.; NOVAL LARA, V. E.; OCHOA PUENTES, C. Magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): Una estructura inorgánica con múltiples aplicaciones en catálisis heterogénea. **Revista Colombiana de Química**, v. 46, n. 1, p. 42, enero 2017.
- CASTRO, P. F. *et al.* High lipase production from *Geotrichum candidum* in reduced time using cottonseed oil: Optimization, easy purification and specificity characterization. **Journal of Chemical Engineering Research Updates**, v. 3, n. 2, p. 60-69, June 2017.
- CETYL ACETATE. [S.I.], [201-]. Disponível em: <https://www.cosmeticsinfo.org/ingredients/cetyl-acetate/>. Acesso em: 22 fev. 2023.

CHANG, Q.; TANG, H. Immobilization of horseradish peroxidase on NH<sub>2</sub>-modified magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> particles and its application in removal of 2,4-dichlorophenol. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 15768-15782, Sept. 2014.

CHEN, G. *et al.* Biodiesel production using magnetic whole-cell biocatalysts by immobilization of *Pseudomonas mendocina* on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, v. 113, p. 86-92, Sept. 2016.

CIRILLO, G. *et al.* Enzyme immobilization on smart polymers: Catalysis on demand. **Reactive and Functional Polymers**, v. 83, p. 62-69, Oct. 2014.

CRUZ-IZQUIERDO, Á. *et al.* Magnetic cross-linked enzyme aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* Lipase: An efficient and stable biocatalyst for biodiesel synthesis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115202, Dec. 2014.

DADFAR, S. M. *et al.* Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 138, p. 302-325, Jan. 2019.

DEL ARCO, J. *et al.* Magnetic micro-macro biocatalysts applied to industrial bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 322, p. 124547, Feb. 2021.

DUAN, M. *et al.* Recent progress in magnetic nanoparticles: synthesis, properties, and applications. **Nanotechnology**, v. 29, n. 45, p. 452001, Nov. 2018.

ELISKASES-LECHNER, F.; GUÉGUEN, M.; PANOFF, J. M. Yeasts and Molds | *Geotrichum candidum*. In: ENCYCLOPEDIA OF DAIRY SCIENCES. [S.l.]: Elsevier, 2011. p. 765-771.

EUROPEAN COMMISSION. **A European Green Deal**. [S.l.], [2019?]. Disponível em: <[https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal\\_en](https://commission.europa.eu/strategy-and-policy/priorities-2019-2024/european-green-deal_en)>. Acesso em: 22 abr. 2023.

FERREIRA, M. M. **Avaliação de diferentes estratégias de imobilização, caracterização das propriedades catalíticas e determinação dos parâmetros termodinâmicos para a lipase produzida por *Geotrichum candidum*, visando seu emprego na produção de ácidos graxos concentrados**. 2017. 95 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2017.

FERREIRA, M. M. *et al.* Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: Kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55-63, Apr. 2018.

FERREIRA, M. M. *et al.* Optimization of free fatty acid production by enzymatic hydrolysis of vegetable oils using a non-commercial lipase from *Geotrichum candidum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 10, p. 1647-1659, oct. 2019.

FRANKS, A. Nanotechnology. **Journal of Physics E: Scientific Instruments**, v. 20, n. 12, p. 1442-1451, Dec. 1987.

FRANQUI, L. S. *et al.* Synthesis and characterization of a magnetic molecularly imprinted polymer for the selective extraction of nicotine and cotinine from urine samples followed by GC-MS analysis. **Analytical Methods**, v. 7, n. 21, p. 9237-9244, 2015.

GONÇALVES FILHO, D.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399-7423, Sept. 2019.

GOODING, D. Final steps to the field theory: Faraday's study of magnetic phenomena, 1845-1850. **Historical Studies in the Physical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 231-275, Jan. 1981.

HATAMI, R. *et al.* Preparation of amino silane magnetic nanocomposite by the sol-gel process and investigation of its antibacterial activity. **Micro & Nano Letters**, v. 14, n. 2, p. 196-201, Feb. 2019.

HATAMI, R. *et al.* Fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Ag-TiO<sub>2</sub> magnetic nanocomposite for antibacterial applications. **Micro & Nano Letters**, v. 17, n. 1, p. 9-15, Jan. 2022.

HERNANDEZ, K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Control of protein immobilization: Coupling immobilization and site-directed mutagenesis to improve biocatalyst or biosensor performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 2, p. 107-122, Feb. 2011.

HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 10, p. 601-607, Oct. 2003.

HOU, C.; QI, Z.; ZHU, H. Preparation of core-shell magnetic polydopamine/alginate biocomposite for *Candida rugosa* lipase immobilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 544-551, Apr. 2015.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, Nov. 2019.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, Nov. 2015.

KOLHATKAR, A. *et al.* Tuning the magnetic properties of nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15977-16009, July 2013.

KOPP, W. *et al.* Synthesis and characterization of robust magnetic carriers for bioprocess applications. **Materials Science and Engineering: B**, v. 193, p. 217-228, Mar. 2015.

KURNAZ YETIM, N. *et al.* Synthesis and characterization of Au and Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> decorated Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PAMAM dendrimer nanocomposites for medical applications. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 589-599, Dec. 2021.

LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, Feb. 2007.

MALDONADO, R. R. *et al.* Evaluation of lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks and bench-scale stirred bioreactor using different impellers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 147-151, Apr. 2012.

MALDONADO, R. R. *et al.* Application of yeast hydrolysate in extracellular lipase production by *Geotrichum candidum* in shaken flasks, stirred tank, and airlift reactors. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 93, n. 9, p. 1524-1530, Sept. 2015.

MATEO, C. *et al.* Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, May 2007.

MIAO, C. *et al.* Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Fuel**, v. 224, p. 774-782, July 2018.

MIGNEAULT, I. *et al.* Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. **BioTechniques**, v. 37, n. 5, p. 790-802, Nov. 2004.

MIGUEZ, J. P. *et al.* Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, p. 296-308, Nov. 2018.

MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 27, p. 12871-12934, 2018.

NARDINI, M. *et al.* Crystal structure of *Pseudomonas aeruginosa* lipase in the open conformation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 40, p. 31219-31225, Oct. 2000.

NÉEL, L. Théorie du traînage magnétique des substances massives dans le domaine de Rayleigh. **Journal de Physique et le Radium**, v. 11, n. 2, p. 49-61, 1950.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; LEHNINGER, A. L. **Lehninger principles of biochemistry**. 7th ed. New York: Houndmills, 2017.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 71-92, Jan. 2013.

NGO, T. P. N. *et al.* Efficient transformation of grease to biodiesel using highly active and easily recyclable magnetic nanobiocatalyst aggregates. **Bioresource Technology**, v. 145, p. 233-239, Oct. 2013.

PACHECO, T. F.; MENDES, T. D. **Guia prático para caracterização de enzimas**. Brasília: Embrapa Bioenergia, 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/222428/1/Guia-pra769tico-para-a-caracterizac807a771o-de-enzimas.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2023

PaDIL. [S.l.]: [s.m.], [2012]. Disponível em: <<https://www.padil.gov.au/>>. Acesso em: 22 abr. 2023.

PUBCHEM. **Cetyl acetate**. [S.l.]: [s.m.], [2004]. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/134976416>. Acesso em: 12 fev. 2023.

RAMOS, E. Z. *et al.* Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43-51, Aug. 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Experimental design and process optimization**. Boca Raton: CRC Press, 2015.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770, Sept. 2019.

SADANA, A.; HENLEY, J. P. Single-step unimolecular non-first-order enzyme deactivation kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 6, p. 717-723, Oct. 1987.

SANTOS, L. F. S. *et al.* Decyl oleate production by enzymatic esterification using *Geotrichum candidum* lipase immobilized on a support prepared from rice husk. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 36, p. 102142, Sept. 2021.

SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. 1.8 Å Refined Structure of the Lipase from *Geotrichum candidum*. **Journal of Molecular Biology**, v. 230, n. 2, p. 575-591, Mar. 1993.

SEENUVASAN, M. *et al.* Magnetic nanoparticles: a versatile carrier for enzymes in bio-processing sectors. **IET Nanobiotechnology**, v. 12, n. 5, p. 535-548, Aug. 2018.

SHAO, Y.-B. *et al.* Characterization and optimization of mesoporous magnetic nanoparticles for immobilization and enhanced performance of porcine pancreatic lipase. **Chemical Papers**, v. 69, n. 10, Jan. 2015.

SHUAI, W. *et al.* A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials: Lipase Immobilization on Nanomaterials. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 496-508, July 2017.

SOUZA, P. M. *et al.* Kinetic and thermodynamic studies of a novel acid protease from *Aspergillus foetidus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p. 17-21, Nov. 2015.

SOUZA, P. M. P. *et al.* Enzyme-support interactions and inactivation conditions determine *Thermomyces lanuginosus* lipase inactivation pathways: Functional and fluorescence studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 191, p. 79-91, Nov. 2021.

SUNG LEE, J. *et al.* Magnetic multi-granule nanoclusters: A model system that exhibits universal size effect of magnetic coercivity. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12135, July 2015.

SWAIN, B. P. (Ed.). Nanostructured materials and their applications. **Singapore: Springer Singapore**, 2021.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Genipin as an emergent tool in the design of biocatalysts: Mechanism of reaction and applications. **Catalysts**, v. 9, n. 12, p. 1035, Dec. 2019.

THANGARAJ, B. *et al.* Lipase NS81006 immobilized on functionalized ferric-silica magnetic nanoparticles for biodiesel production. **Biofuels**, p. 1-9, Dec. 2017.

THANGARAJ, B. *et al.* Effect of silica coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4694-4706, Dec. 2019.

TURAL, B. *et al.* Carbonylation reactivity of benzaldehyde lyase (BAL, EC 4.1.2.38) covalently attached to magnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 24, n. 5-6, p. 260-268, Mar. 2013.

VAGHARI, H. *et al.* Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, n. 2, p. 223-233, Feb. 2016.

VAN TILBURGH, H. *et al.* Structure of the pancreatic lipase–procolipase complex. **Nature**, v. 359, n. 6391, p. 159–162, set. 1992.

VEIT, T. Biocatalysis for the Production of cosmetic ingredients. **Engineering in Life Sciences**, v. 4, n. 6, p. 508-511, Dec. 2004.

VESCOVI, V. *et al.* Improved catalytic properties of *Candida antarctica* lipase B multi-attached on tailor-made hydrophobic silica containing octyl and multifunctional amino-glutaraldehyde spacer arms. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 12, p. 2055-2066, Dec. 2016.

WOODLEY, J. M. New frontiers in biocatalysis for sustainable synthesis. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 21, p. 22-26, Feb. 2020.

WU, S. *et al.* Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 1, p. 88-119, Jan. 2021.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface functionalization strategies. **Nanoscale Research Letters**, v. 3, n. 11, p. 397-415, Nov. 2008.

XU, J. *et al.* Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11465-11486, Aug. 2014.

YANG, X. *et al.* Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 324-332, Aug. 2019.

ZDARTA, J. *et al.* A General overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, Feb. 2018.

ZHANG, W.-W. *et al.* Surfactant-activated magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 115, p. 83-89, May 2015.

ZHONG, L. *et al.* Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207-222, June 2020.