

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CURSO SUPERIOR DE LICENCIATURA EM QUÍMICA

TAYNNÁ CRISTINA DA CUNHA FERREIRA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE COBALTO NA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

APUCARANA

2019

TAYNNÁ CRISTINA DA CUNHA FERREIRA

**NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE COBALTO NA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação, apresentado ao curso superior de Licenciatura em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Apucarana, como requisito parcial para obtenção do título de Licenciada em Química.

Orientador: Prof^a Dr^a Milena Martins Andrade
Co-orientador: Prof^o Me Rafael Block Samulewski

APUCARANA

2019

*A todos os que acreditaram em
mim e também àqueles que
não acreditaram.*

AGRADECIMENTOS

Enquanto pensava se escreveria ou não esses agradecimentos me deparei com inúmeras pessoas que merecem muito mais que apenas isso. Então aqui vai meus agradecimentos.

À Energia Divina que habita no Universo que me presenteou com a vida, com o melhor lugar do mundo, com importantes aprendizados na minha jornada, com as pessoas mais incríveis que poderia conhecer e com os momentos mais inesquecíveis.

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado, enfrentou tudo por mim, ensinou-me valores, ajudou-me e foi espelho para me tornar a mulher forte que sou hoje. Ao meu pai, que mesmo discordando em muitas coisas, sempre me deu seu apoio e me ajudou quando precisei.

À minha avó pelo colo quentinho quando queria descanso, pelas comidas gostosas, pela força que me fez continuar, por todo amor, acalento e ensinamentos ancestrais. Aos meus tios e primos, que apesar das brincadeiras, sei que sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram quando necessitei. Especialmente ao meu tio Claudio que sempre me deu orientação e me incentivou a seguir carreira acadêmica, além de todos os ensinamentos de mundo que me passou.

À minha irmã e cunhado que vieram ao meu socorro quando precisei e pelos meus maiores presentes – meu sobrinho e afilhado Nicollas e minha sobrinha Nicolly – que são minha alegria.

Aos meus amados orientadores Block e Milena, que sempre tiveram paciência em me ensinar e me receberam com tanto carinho nessa caminhada. Por me mostrarem o quanto a Química é linda, por toda força e orientação que me deram. À vocês, serei eternamente grata.

Às minhas melhores amigas Beatriz, Carol e Gabi, que foram luz e arte nos dias mais cinzentos, por acreditarem em mim quando eu mesma deixei de acreditar, por todo o apoio, por todos os conselhos, por me guiarem e me mostrarem que eu conseguiria chegar onde cheguei hoje, porque estiveram comigo em todos os momentos e não me deixaram desistir. Por tudo que aprendemos juntas e vivemos juntas. Eu amo muito vocês.

Aos meus colegas de laboratório Michael, Ricardo, Donizete, Guilherme e outros que sempre que possível me ajudaram e me deram seu apoio, fizeram-me rir quando estava tudo errado e me incentivaram a ir até o fim.

A todos os amigos que conheci desde que ingressei na universidade que estiveram compartilhando dos melhores e piores momentos que vivi, de longa e de curta data: Camila, Amanda, Alessandra, Luara, Siraque, Matheus, Duany, Vitor, Thamires, Amanda, Karol, Ana Rafaela, e outros, que sempre me deram força, estudaram comigo, puxaram minha orelha, ensinaram-me tanto e me incentivaram a continuar. Às pessoas incríveis que conheci no Movimento Estudantil, bares e outros. À tudo que vivi no Centro Acadêmico.

Aos professores que me ajudaram em laboratório, sala de aula, corredores e afins – ao Prof Augusto pelas melhores aulas de Físico-Química, pelas dicas de vida e de laboratório, por ser tão atencioso; ao Prof André pela ajuda em laboratório, ao Prof Johnny e à Prof Rúbia pela ajuda quando estive perdida; à Prof Patricia, sempre tão carinhosa; ao Prof Bento que mesmo com os desentendimentos me ensinou e mostrou tanto; à querida Prof Angélica que foi um anjo na minha vida desde que se tornou coordenadora - e a todos os que já passaram por mim e me deram oportunidades de crescer dentro da UTFPR.

Aos técnicos de laboratório Luana e Orlando por serem atenciosos e auxiliarem meus processos. Aos queridos servidores da UTFPR - seguranças, terceirizados da limpeza, do RU, técnicos administrativos, NUAPE, Alessandra e todos os outros órgãos - por todos os serviços prestados.

A todos aqueles que já me estenderam a mão, deram-me um abraço, ofereceram-me um sorriso. A todos, meus mais sinceros agradecimentos.



Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná**
Câmpus Apucarana
COLIQ – Coordenação do Curso
Superior de Licenciatura em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

Nanopartículas Magnéticas de Cobalto na Imobilização de Lipases

por

Taynná Cristina da Cunha Ferreira

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi apresentado aos 29 dias do mês de novembro do ano de 2019, às 16 horas, como requisito parcial para a obtenção do título de Licenciada em Química, linha de pesquisa Biomateriais e Biocatálise, do Curso Superior de Licenciatura em Química da UTFPR – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela banca examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a banca examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Milena Martins Andrade – ORIENTADORA

Prof^a Dr^a Silvana Fernandes Montanher – EXAMINADOR

Prof^a Dr^a Maria Carolina Sergi Gomes – EXAMINADOR

“A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso”.

RESUMO

FERREIRA, T. C. da C. Nanopartículas Magnéticas de Cobalto na Imobilização de Lipases. 2019. 57 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2019.

Catalisadores biológicos, como as lipases, têm surgido como alternativa aos catalisadores químicos devido a atual preocupação na proteção do meio ambiente. As lipases têm ganhado destaque nos estudos catalíticos, por serem versáteis e atuarem em diversas reações como hidrólise e síntese. Sua capacidade de converter óleo vegetal em ésteres metílicos ou outro éster de álcool de cadeia curta em uma única reação de transesterificação, combinada com a necessidade de produção de biocombustíveis, tem chamado a atenção para seu uso na produção de biodiesel. Entretanto, sua aplicação é desfavorecida pelos altos custos. Algumas alternativas para a redução de custo são o uso de resíduos agroindustriais, para produção desta enzima, além de imobilizá-la em um suporte de baixo custo, que permita fácil recuperação e dê maior estabilidade à enzima, quando comparado com a forma livre. Pensando nisso, este trabalho teve como objetivo testar a eficiência de nanopartículas magnéticas de cobalto, com e sem celite, como suporte para a imobilização de lipases por meio de planejamentos fatoriais e utilizar o biocatalisador obtido na reação de hidroesterificação para produção de biodiesel. Neste trabalho, a lipase utilizada foi produzida pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, por fermentação submersa, em meios contendo torta de soja e glicerol como substrato em condição otimizada previamente. As enzimas produzidas foram imobilizadas nos suportes por adsorção. Os suportes com nanopartículas magnéticas de cobalto foram produzidos de forma eficiente, comprovados pela notável capacidade magnética. Altas atividades de lipase foram obtidas em ambos os suportes e a máxima ($1527 \text{ U/g}_{\text{NPS+CE}}$) prevista pelo modelo pode ser alcançada utilizando a temperatura de $34 \text{ }^\circ\text{C}$ e tempo de 27 minutos. As análises morfológicas do material sugerem que as enzimas imobilizadas se organizam em aglomerados, interagindo principalmente com as nanopartículas. As análises de infravermelho demonstraram as bandas características do material celite e da enzima, evidenciando que a enzima foi imobilizada. O biocatalisador produzido a partir de nanopartículas de cobalto sem celite proporcionou a melhor conversão em ésteres (20%), evidenciada também pelo ensaio de índice de acidez. Os resultados obtidos neste trabalho provaram que as nanopartículas magnéticas de cobalto com e sem celite são suportes eficazes para a imobilização de lipases, constituindo um biocatalisador de fácil recuperação e capazes de hidroesterificar matérias graxas para produção de ésteres de ácidos graxos. Estudos futuros serão empregados para aumentar a taxa de conversão.

Palavras-chave: Celite. Adsorção. Hidroesterificação. *Botryosphaeria ribis* EC-01.

ABSTRACT

FERREIRA, T. C. da C. Nanopartículas Magnéticas de Cobalto na Imobilização de Lipases. 2019. 57 f. Cobalt Magnetic Nanoparticles in Lipase Immobilization. (Chemistry Graduation), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2019.

Biological catalysts, such as lipases, have emerged as an alternative to chemical catalysts due to the current concern for environmental protection. Lipases have gained prominence in catalytic studies because they are versatile and act in various reactions such as hydrolysis and synthesis. Its ability to convert vegetable oil to methyl esters or another short-chain alcohol ester in a single transesterification reaction, combined with the need for biofuel production, has drawn attention to its use in biodiesel production. However, its application is disadvantaged by the high costs. Some alternatives for cost reduction are the use of agroindustrial residues for the production of this enzyme, besides immobilizing it in a low cost support that allows easy recovery and gives greater stability to the enzyme when compared to the free form. With this in mind, this work aimed to test the efficiency of cobalt magnetic nanoparticles, with and without celite, as support for lipase immobilization through factorial design and to use the biocatalyst obtained in the hydroesterification reaction for biodiesel production. In this work, the lipase used was produced by the *Botryosphaeria ribis* EC-01 fungus by submerged fermentation in media containing soybean cake and glycerol as substrate in previously optimized condition. The enzymes produced were immobilized on the supports by adsorption. Supports with cobalt magnetic nanoparticles were produced efficiently, proven by their remarkable magnetic capacity. High lipase activities were obtained on both supports and the maximum (1527 U / gNPS + EC) predicted by the model can be achieved using a temperature of 34 °C and a time of 27 minutes. The morphological analyzes of the material suggest that the immobilized enzymes are organized in clusters, interacting mainly with the nanoparticles. Infrared analyzes showed the characteristic bands of celite material and enzyme, showing that the enzyme was immobilized. The biocatalyst made from celite-free cobalt nanoparticles provided the best conversion to esters (20%), also evidenced by the acidity index test. The results obtained in this work proved that the cobalt magnetic nanoparticles with and without celite are effective supports for the immobilization of lipases, constituting a biocatalyst that is easy to recover and capable of hydroesterifying fatty materials for the production of fatty acid esters. Future studies will be employed to increase the cover rate.

Keywords: Celite. Adsorption. Hydroesterification. *Botryosphaeria ribis* EC-01.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meio BDA (Batata Dextrose Agar).....	26
Tabela 2 - Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar).....	26
Tabela 3 - Meio mínimo de sais de Vogel concentrado 50 vezes	27
Tabela 4 – Planejamento Fatorial.....	32
Tabela 5 - Produção de lipases por <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 antes e após concentração e diálise.....	37
Tabela 6 - Planejamento fatorial para a imobilização de lipases em celite impregnado com nanopartículas magnéticas.	39
Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 22 para a imobilização de lipase em celite impregnado com nanopartículas magnéticas (U/gN _{PS+CE}).....	40
Tabela 8 - Planejamento fatorial para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas de cobalto.	41
Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 22 para a imobilização de lipase em nanopartículas magnéticas de cobalto (U/gN _{PS}).	42
Tabela 10 - Índice de acidez dos óleos utilizados antes da utilização, após a hidrólise e após a esterificação.	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de hidrólise catalisada pelas lipases.....	15
Figura 2 – Reações catalisadas por lipases	16
Figura 3 – Métodos de imobilização de enzimas.....	20
Figura 4 - Estrutura espinélio para o Co_3O_4 onde as valências Co^{2+} e Co^{3+} ocupam interstícios tetraédricos e octaédricos respectivamente e o O^{2+} ocupa os vértices e as faces da estrutura cúbica.....	25
Figura 5 - <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 crescido em VGA após 5 dias de cultivo a 28 ± 2 °C	28
Figura 6 – Nanopartículas de cobalto antes da lavagem	30
Figura 7 - Nanopartículas de cobalto incorporadas a celite antes da lavagem	31
Figura 8 - Separação de fases após hidrólise do óleo contendo o sebo bovino utilizando nanopartículas de cobalto impregnadas em celite (direita) e nanopartículas de cobalto (esquerda)	34
Figura 9 - Separação de fases após esterificação utilizando nanopartículas de cobalto impregnadas em celite (direita) e nanopartículas de cobalto (esquerda) recuperadas na etapa 1	35
Figura 10 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas magnéticas de cobalto sem celite.....	38
Figura 11 - Aplicação de campo magnético nas nanopartículas de cobalto com celite	38
Figura 12 – Superfície de resposta para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas impregnadas em celite (NPS+CE)	40
Figura 13 - Superfície de contorno para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas (NPS)	43
Figura 14 - Espectro FTIR das nanopartículas magnéticas antes e após imobilização	44
Figura 15 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas magnéticas de cobalto antes (a) e após (b) a imobilização de lipases	45
Figura 16 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas magnéticas de cobalto impregnadas em celite antes (a) e após (b) a imobilização de lipases	46
Figura 17 - Micrografia obtida da superfície do celite.....	46
Figura 18 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas magnéticas de cobalto impregnadas em celite após a imobilização de lipases	47
Figura 19 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura dos materiais obtidos antes (a e b) e após (c e d) a imobilização de lipases.....	48
Figura 20 - Cromatograma obtido na reação de hidroesterificação utilizando lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas de cobalto	49

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	15
3.1 LIPASES	15
3.2 PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES	17
3.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES.....	19
3.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	22
3.4.1 ÓXIDO DE COBALTO.....	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 MATERIAIS.....	26
4.1.1 MEIOS DE CULTIVO	26
4.2 MÉTODOS	27
4.2.1 PRODUÇÃO DE INÓCULO E OBTENÇÃO DE LIPASES.....	27
4.2.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE LIPASE LIVRE E IMOBILIZADA.....	28
4.2.3 PRODUÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE COBALTO.....	30
4.2.4 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE BOTRYOSPHERA RIBIS EC-01 DE ACORDO COM PLANEJAMENTOS FATORIAIS.....	31
4.2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO	32
4.2.6 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	33
4.2.7 PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	33
4.2.7.1 ETAPA 1: HIDRÓLISE DO ÓLEO DE SOJA E DA ENTRADA DA TRANS	33
4.2.7.2 ETAPA 2: ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	35
4.2.8 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ.....	36
4.2.9 ANÁLISE DOS ÉSTERES POR CROMATOGRAFIA GASOSA	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	37
5.1 PRODUÇÃO DE INÓCULO E OBTENÇÃO DE LIPASES	37
5.2 PRODUÇÃO DO SUPORTES.....	37
5.3 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE BOTRYOSPHERA RIBIS EC-01 DE ACORDO COM PLANEJAMENTOS FATORIAIS.....	39
5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	44
5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	45
5.6 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ.....	48
5.7 ANÁLISE DOS ÉSTERES POR CROMATOGRAFIA GASOSA.....	49
6 CONCLUSÃO.....	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

As enzimas são catalisadores biológicos de alta versatilidade podendo atuar em diferentes faixas de pH, além de serem estáveis à altas temperaturas. O uso de enzimas para substituir os catalisadores químicos possui vantagens como biodegradabilidade, condições moderadas de reação, alta especificidade e eficiência, com menor geração de produtos indesejáveis, entre outros. No entanto, sua aplicação industrial é limitada, sobretudo por seus custos, que inviabilizam a competição com a produção química, otimizada e amplamente utilizada.

Sendo assim, a utilização de resíduos industriais muito produzidos em países como o Brasil, como os óleos e as tortas vegetais, são uma alternativa eficaz para redução dos custos da produção de enzimas, pois esses substratos, além de baratos, constituem excelentes fontes de proteínas e carboidratos (ANDRADE, 2013).

Fungos do gênero *Botryosphaeria* secretam diferentes enzimas como lipases, lacases, pectinases, beta-1,3-glucanases, celulasas, xilanases, amilases e inulinases (CUNHA et al., 2003). *Botryosphaeria ribis* EC-01 foi previamente selecionado como bom produtor de lipases entre nove isolados de *Botryosphaeria spp.* quando cultivado em diferentes óleos vegetais e glicerol por fermentação submersa (MESSIAS et al., 2009).

As lipases são enzimas que se destacam entre as hidrolases devido às suas múltiplas aplicações por sua capacidade de catalisar reações como, transesterificação, aminólises, entre outras. Estas enzimas são amplamente distribuídas em plantas, animais e microrganismos, sendo utilizadas nas indústrias de detergentes, medicamentos, alimentos (panificação, queijos, chás), têxteis, polpa e papel, curtumes, cosméticos, biodiesel, biossensores e, também, no tratamento de efluentes (SHARMA et al., 2011).

As aplicações das enzimas podem ser melhoradas quando imobilizadas, podendo conferir-lhes maior estabilidade e resistência, além de preservar a atividade da enzima por vários ciclos catalíticos. (MATEO et al., 2007).

Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas apresentam facilidade de recuperação e reutilização, podendo ser usadas em sistemas contínuos. Além

disso, a utilização deste suporte permite a recuperação do catalisador por aplicação de campo magnético.

Desta forma, este projeto teve como objetivo produzir nanopartículas magnéticas de tetróxido de cobalto (Co_3O_4) e utilizá-las como suporte para a imobilização de lipases.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biocatalisador a partir de lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas de cobalto.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

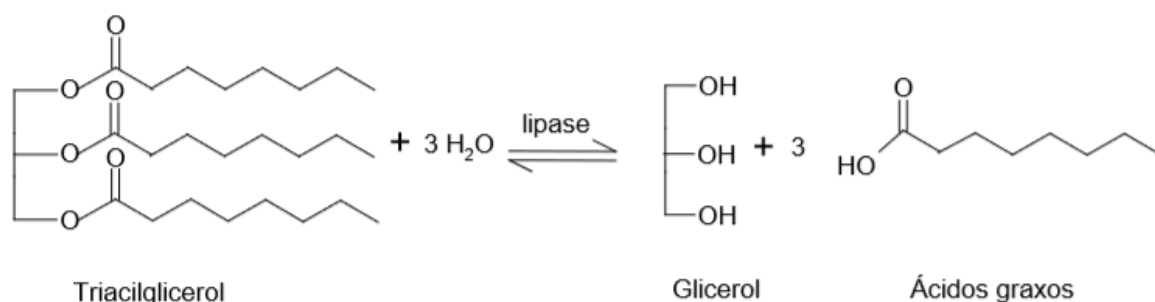
- I. Produzir lipases por fermentação submersa em condição previamente otimizada;
- II. Sintetizar nanopartículas magnéticas de cobalto;
- III. Incorporar celite nas nanopartículas magnéticas de cobalto;
- IV. Imobilizar lipase em nanopartículas magnéticas de cobalto com e sem celite de acordo com planejamentos fatoriais (2^2);
- V. Caracterizar as nanopartículas obtidas antes e após a imobilização;
- VI. Determinar a atividade enzimática antes e após imobilização;
- VII. Aplicar a enzima imobilizada na melhor condição em reação de hidroesterificação.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LIPASES

Lipase é o nome dado a um grupo de enzimas que fazem parte da classe das hidrolases, que atuam em ligações éster e são definidas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3), pois hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (Figura 1), constituída por mais de 10 átomos de carbono, em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998).

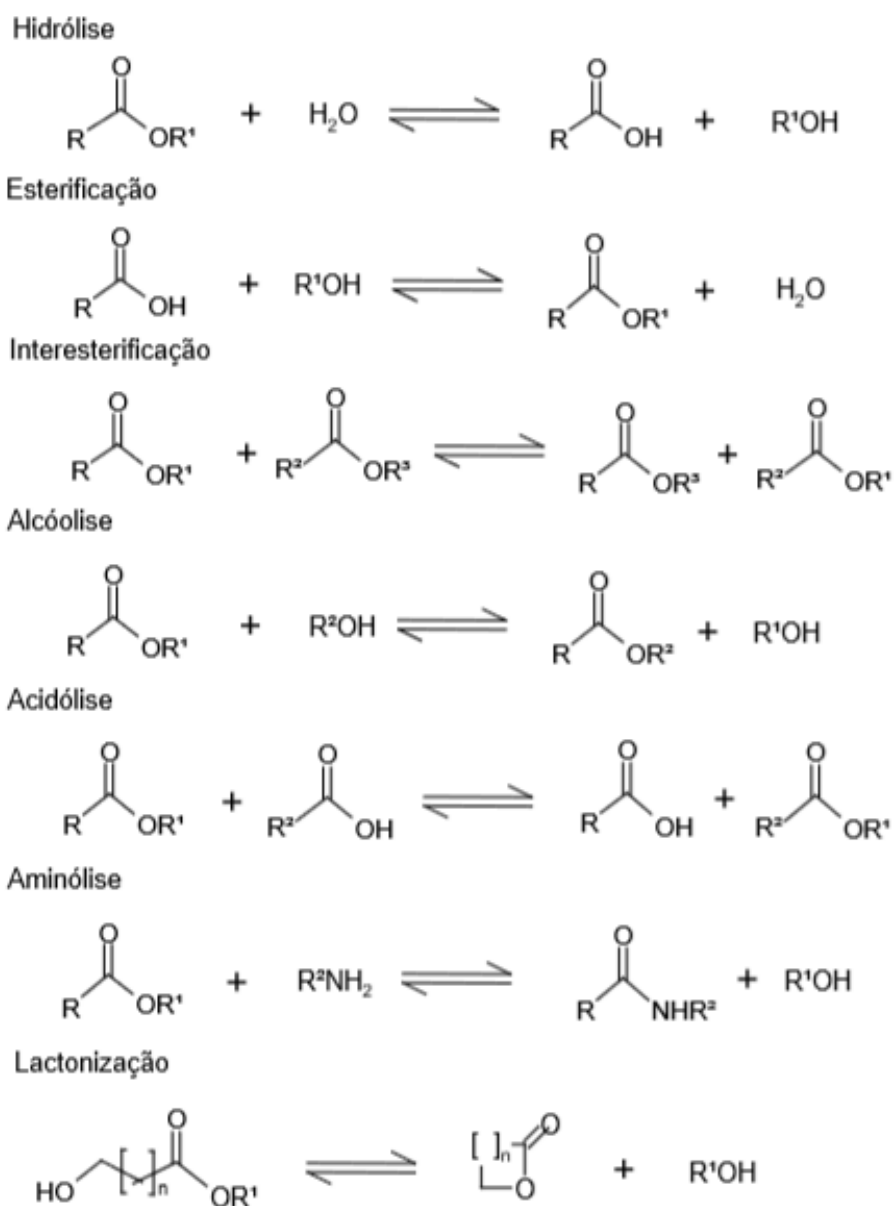
Figura 1 - Reação de hidrólise catalisada pelas lipases



Fonte: Jaeger e Reetz (1998)

As lipases se destacam em aplicações biotecnológicas por sua versatilidade de reações de hidrólise, esterificação, transesterificação (interesterificação, alcóólise e acidólise), aminólises (síntese de amidas) e lactonização (esterificação intramolecular), conforme a Figura 2, sendo que a fração de água no meio reacional é um fator determinante para o equilíbrio da reação, no sentido da síntese ou da hidrólise (SHARMA et al., 2001).

Figura 2 – Reações catalisadas por lipases



Fonte: PAQUES e MACEDO (2006)

Estas enzimas atuam em ampla faixa de pH, são estáveis à altas temperaturas; possuem elevada especificidade e propriedades de régio, quimio e enantiosseletividade, o que as tornam aplicáveis a diversos processos industriais.

3.2 PRODUÇÃO E APLICAÇÃO DE LIPASES

As principais fontes de obtenção de lipase são os microorganismos, podendo, também, ser produzidas por eucariotos superiores (plantas e animais) e procariotos (bactérias e actinomicetos). Dentre os fungos produtores de lipases destacam-se os gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Humicola* e *Candida* (GHOSH et. al., 1996).

Nove isolados do gênero *Botryosphaeria* foram cultivados em meios separados contendo diferentes óleos vegetais e glicerol em condições de fermentação submersa, para selecionar os melhores produtores de lacase e lipase, onde se destacaram respectivamente *B. rhodina* MAMB-05 e *B. ribis* EC-01 (MESSIAS et al., 2009).

As lipases microbianas podem ser obtidas por fermentação submersa (FSub), que está associada ao crescimento microbiano e às variações de composição e condições de cultivo, como pH, temperatura, agitação, entre outros; ou fermentação em estado sólido (FES), utilizando substratos insolúveis, que apresentam baixas porcentagens de água em sua composição (MESSIAS et. al., 2011).

Os resíduos agroindustriais são excelentes fontes de nutrientes para o cultivo de microorganismos, e, quando utilizados como matérias-primas para a produção de lipases, além de auxiliar na reciclagem desses resíduos, geram também uma diminuição no custo final de produção destas enzimas (BARBOSA et al., 2011; ANDRADE et al., 2013).

Em estudos anteriores verificou-se que o fungo *B. ribis* EC-01 produz altos níveis de lipase em fermentação submersa, quando cultivado somente em farelo de soja e presença de água destilada, entretanto, Andrade et. al. (2013, 2014) verificou que a adição de glicerol ao meio de cultivo, aumenta significativamente a atividade da lipase por esse isolado fúngico, demonstrando uma alternativa sustentável para a produção dessas enzimas.

Em virtude das inúmeras reações que as lipases podem catalisar, elas apresentam grande faixa de atuação, sendo aplicadas em diversas áreas da indústria. No Quadro 1 temos alguns exemplos de aplicações industriais de lipases.

Quadro 1 - Aplicações industriais de lipases

Indústria	Aplicação
Indústria de alimentos	Modificação de óleos e gorduras; desenvolvimento de sabores, amadurecimento de queijos e EMC ((Enzyme Modified Cheeses).
Molhos e condimentos	Melhoria na qualidade de maioneses e molhos.
Processamento de carnes	Desenvolvimento de sabor e redução no conteúdo de gorduras
Óleos e gorduras	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídeos.
Química fina	Síntese de ésteres e resolução de racematos.
Detergentes	Adicionada a detergentes pela sua capacidade de hidrólise de gorduras/lipídeos.
Setor médico	Auxiliares de digestão; produção de medicamentos.
Biossensores	Determinação de lipídeos no sangue.
Biorremediação	Tratamento de águas residuais; degradação de óleo em ambientes costeiros; processamento enzimático de óleos industriais.
Couro	Operam na imersão, depilação, escovação e desengorduramento na fabricação de couro.
Tratamento de resíduos	Decomposição de lipídeos de efluentes.
Cosméticos e perfumaria	Lipases utilizadas em cuidados pessoais como: limpeza, suavização, aroma e coloração, por apresentarem atividade como surfactante e produção de fragrâncias.
Indústria de papel e celulose	Remoção da fração lipídica da madeira que interfere na elaboração da polpa de papel; remoção de manchas lipídicas durante a reciclagem de papel; evitar a formação de materiais pegajosos.
Produção de biodiesel	Grupo de ésteres formados por reações de transesterificação entre ácidos graxos e um álcool na presença do biocatalisador.

Fonte: Mehta, et al (2017); Sharma et al (2016).

O biodiesel é uma alternativa ecológica e renovável ao diesel de petróleo, uma vez que reduz a emissão de gases, como o dióxido e monóxido de carbono. É composto por monoésteres de ácidos graxos não tóxicos e biodegradáveis, podendo ser gerado a partir de matéria-prima sustentável, como óleos vegetais.

As reações de hidroesterificação de gorduras vegetais e animais podem ser realizadas por catalisadores químicos. Industrialmente, a obtenção do biodiesel a partir de óleo vegetal se dá por reações de alcoólise, com o uso de metanol e catalisadores homogêneos (ácido ou básico). O uso desse método produz altos rendimentos, no entanto, o metanol é um reagente fóssil derivado do petróleo, além disso, os catalisadores homogêneos necessitam de diversas etapas de purificação, tornando o método agressivo ao meio ambiente. Nesse sentido, o uso de catalisadores heterogêneos constitui uma opção tecnológica vantajosa, pois é de fácil separação do meio reacional, gera poucos problemas com rejeitos, é de fácil manuseio e possui possibilidade de reutilização, além da redução de custos e etapas de purificação do produto final. Assim, o emprego de lipases imobilizadas e de baixo custo, como catalisadores biológicos têm crescido nesse ramo, devido à sua capacidade de catálise em diversas reações químicas e por ser um material biodegradável (JEGANNATHAN et al., 2008; CRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; TAHER; AL-ZUHAIR, 2019)

Em estudos anteriores a lipase produzida por *B. ribis* EC-01 apresentou boa estabilidade térmica e alta afinidade para ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, propriedades estas que tornam atrativa para utilização na produção de biodiesel (ANDRADE, 2013).

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

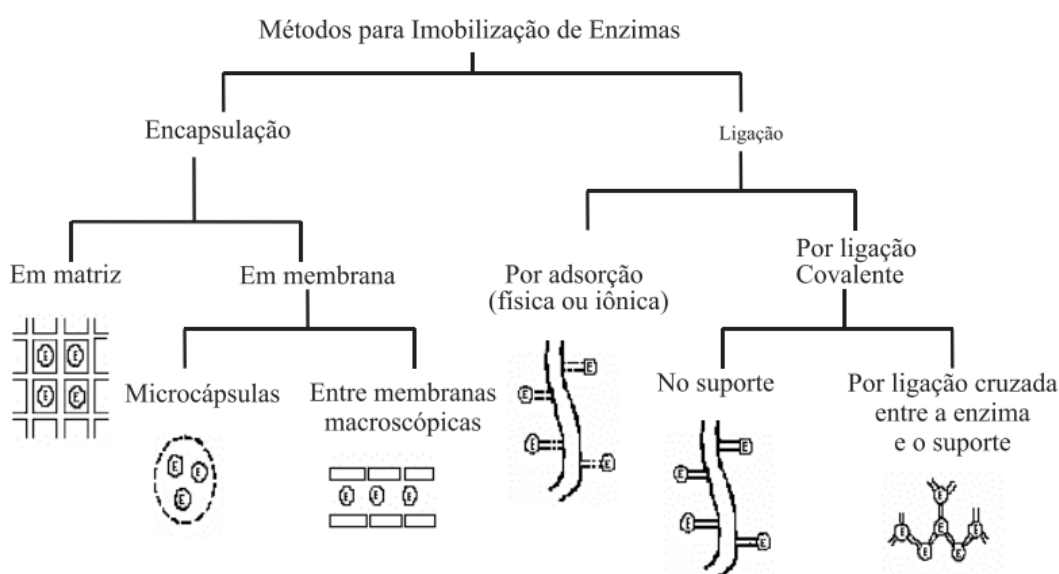
O uso de enzimas, principalmente as lipases, está crescendo consideravelmente devido às suas propriedades atrativas e reações que são capazes de catalisar. No entanto, a aplicação de enzimas em sua forma livre é dificultada pela frequente desnaturação e inativação durante o processo reacional, além da dificuldade de recuperação e reciclagem deste biocatalisador.

Com isso, novas técnicas de imobilização têm sido estudadas a fim de resolver este problema, uma vez em que a enzima imobilizada apresenta maior

estabilidade, fácil recuperação e reutilização, além de não perder sua atividade durante o processo reacional.

A imobilização pode ocorrer por vários métodos, que são definidos baseando-se em mecanismos físicos e químicos, sendo que os mais comuns são adsorção e ligação covalente - ou ligação cruzada. A Figura 3 apresenta esquematicamente alguns dos métodos e técnicas utilizados para imobilização enzimática (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Figura 3 – Métodos de imobilização de enzimas



Fonte: DALLA-VECCHIA *et al.* (2004)

Na imobilização por adsorção a enzima se liga ao suporte por ligações de baixa energia, como interações de *Van der Waals* - ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas.

Além da escolha da metodologia, a escolha do suporte é de suma importância para o sucesso da imobilização. Para tal, vários materiais podem ser usados, como polietileno, polipropileno, celite, resina sintética, celulose, partículas e nanopartículas magnéticas, entre outros. A escolha do suporte depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo. É preferível a utilização de suportes hidrofóbicos, uma vez que tendem a uma baixa competição

entre a lipase e a água pelo suporte, proporcionando assim bons resultados de imobilização (SCHERER et al., 2011).

O Celite é um material quimicamente inerte e impermeável, composto basicamente por sílica (SiO_2), também chamado de terra diatomácea, proveniente de carapaças de animais marinhos como algas microscópicas (SOUZA et al., 2003), é muito utilizado para adsorção de enzimas por apresentar alta porosidade e ser de baixo custo (SOUMANOU; BORNSCHEUER, 2003; SHA; GUPTA, 2007) .

Além da escolha do suporte, os fatores pH, temperatura, tempo de contato e agentes funcionalizantes também podem interferir no rendimento da imobilização de lipases. A metodologia de superfície de resposta (MSR) é uma ferramenta estatística que auxilia na escolha das melhores condições a serem utilizadas. Essa é uma técnica baseada no uso de planejamentos fatoriais apresentando duas etapas distintas, a modelagem e o deslocamento, visando a obtenção de um modelo que represente a máxima resposta de interesse (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2007). Esta metodologia ajuda na identificação de efeitos e interações de diferentes variáveis envolvidas no processo, como redução dos experimentos, e, com isso, redução de custos. Essa ferramenta tem sido amplamente utilizada na imobilização de enzimas a fim de investigar diferentes condições para a otimização da atividade e estabilidade de enzimas imobilizadas (CHANG et al., 2007).

As nanopartículas magnéticas têm chamado a atenção como suporte para imobilização de lipases (BILAL et al., 2018). O suporte mais utilizado é a magnetita (Fe_3O_4), que geralmente é ativada com algum agente químico, e a imobilização se dá por ligação covalente. O Quadro 2 apresenta alguns estudos com esses materiais utilizados como suportes para imobilizar lipases, bem como as metodologias e condições utilizadas.

Quadro 2 - Suportes e métodos utilizados para imobilização de Lipases

Suporte	Agente Funcionalizante	Método de Imobilização	Condições	Referência
Fe ₃ O ₄		Adsorção física	2, 4, 6 e 24 horas, 150 rpm, 25 °C	Tavares et. al., 2013
Fe ₃ O ₄ funcionalizado com amino	APTES	Ligação covalente	2-5 horas, 1100 rpm, 25 °C	Pashangeh et. al., 2017
Nanopartículas magnéticas	Glutaraldeído	Ligação covalente	Agitação vigorosa, variadas quantidades de lipase, temperatura e tempo de reação.	Mahmoud, 2016
Fe ₃ O ₄	Ácido Cítrico		3 horas, 200 rpm, 4 °C	Sarno et. al., 2017
Fe ₃ O ₄	APTES e Glutaraldeído		1 hora, 20-250 rpm	Costa et. al., 2014
Fe ₃ O ₄	Lauril Sulfato de Sódio		24 horas, 600 rpm,	Bork et. al., 2014

Fonte: Próprio autor

A principal vantagem do uso de nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de enzimas é facilidade de recuperação do biocatalisador do meio reacional, além disso destacam-se características, como a grande área superficial, mobilidade e alta transferência de massa (BILAL et al., 2018).

3.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Nanopartículas magnéticas (NPMS) são compostos formados por átomos ou moléculas que apresentam resposta a um campo magnético e possuem um tamanho bastante reduzido, entre 1 a 100 nm. Sua composição pode ser originada por diferentes elementos magnéticos como o ferro, cobalto, manganês, cobre e seus respectivos óxidos, além de outros metais de transição. Sendo uma de suas grandes vantagens a facilidade de manipulação por meio de um campo magnético externo (GUBIN, 2009).

Tais metais podem adotar diferentes estados de oxidação e configurações eletrônicas (Fe²⁺/Fe³⁺, Co³⁺/Co⁴⁺, Mn³⁺/Mn⁴⁺, Cu²⁺/Cu³⁺), manifestando a

possibilidade de deslocalização eletrônica sobre a estrutura metal-oxigênio, quando as nanopartículas magnéticas possuem natureza de óxidos. Os óxidos desses elementos podem ser obtidos através de diversos métodos, como: coprecipitação química, métodos físicos, sol-gel, hidrotérmica, métodos microbianos nos quais os NPMS se formam em um processo de biomineralização, método mecano-químico, dentre outros (MAKHLOUF et al., 2013; MEDINA et al., 2019).

As NPMS apresentam grande área superficial, logo, possuem alta energia superficial, e são consideradas superparamagnéticas, dependendo do acoplamento magnético entre os centros metálicos. As interações dipolo magnético e dipolo-campo magnético podem gerar aglomerados em escala micro, diminuindo sua área superficial. Com o revestimento adequado, as NPMS não sofrem aglomeração e podem ser dispersas em diferentes soluções, o que permite sua aplicação sem a formação de agregados. Os métodos de revestimento mais utilizados são: *in situ*, adsorção pós-síntese ou enxerto pós-síntese (MOHAMMED et al., 2017).

As NPMS têm despertado interesse nos ramos da física, química, medicina, materiais e meio ambiente, devido às suas múltiplas aplicações e reações catalíticas. Estas aplicações dependem das modificações em sua superfície com compostos que contenham grupos funcionais capazes de interagir com os analitos, fármacos, toxinas ou poluentes.

Entre as aplicações descritas até o momento, podemos destacar a produção de biossensores magnéticos, diagnósticos médicos, catálise, bioprocessos e remediação ambiental (remoção de metais tóxicos dos meios aquosos). Suas aplicações dependem muitas vezes do uso de campos magnéticos que manipulam suas propriedades, decorrente da efetividade do momento magnético das partículas e do gradiente do campo.

Suportes magnéticos foram aplicados para imobilizar enzimas pela primeira vez em 1973 e atualmente têm sido amplamente utilizados para este fim. Enzimas imobilizadas em suportes magnéticos podem ser mais facilmente recuperadas de um meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo. Além da redução dos custos operacionais, sendo reutilizadas em variados processos sem perder sua capacidade magnética.

As vantagens do uso de nanopartículas magnéticas como suporte para a imobilização são:

- Facilidade de extração do meio reacional;
- Fácil obtenção, dependendo do método utilizado na síntese;
- Possível funcionalização da superfície;
- Resistência a altas temperaturas;
- As nanoestruturas dão estabilidade às enzimas;
- Reciclável.

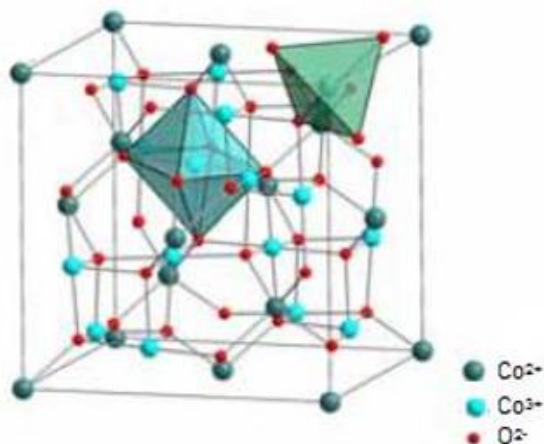
A nanopartícula mais utilizada para fins de imobilização é a magnetita (Fe_3O_4), que apresenta uma estrutura cristalina, formada por um spinel invertido, onde Fe^{3+} ocupam espaços tetraédricos e centros de ferro (II/III) alternados em centros octaédricos.

3.4.1 Óxido de Cobalto

O cobalto apresenta dois estados principais de oxidação: + II e + III. Estas valências permitem a formação dos seguintes óxidos: CoO , Co_2O_3 e o Co_3O_4 . O tetraóxido de tricobalto (Co_3O_4) é o mais comum entre os óxidos e apresenta estrutura cristalina tipo espinélio, AB_2O_4 , baseada em uma estrutura cúbica fechada de íons óxidos, onde os íons Co^{+2} ocupam os 8 sítios tetraédricos 8 A e os íons Co^{+3} ocupam os sítios octaédricos 16 B.

O Co_3O_4 possui propriedades magnéticas assim como a magnetita pelo fato de suas estruturas cristalinas serem idênticas e possuírem os estados de oxidação +II e +III em sítios octaédricos e tetraédricos, como observado na Figura 4.

Figura 4 - Estrutura espinélio para o Co_3O_4 onde as valências Co^{2+} e Co^{3+} ocupam interstícios tetraédricos e octaédricos respectivamente e o O^{2-} ocupa os vértices e as faces da estrutura cúbica.



Fonte: Adptado de MEDINA (2017)

Suas estruturas idênticas permitem comparações, no entanto, as nanopartículas magnéticas de cobalto (Co_3O_4) são mais estáveis em condições ambientes, na contramão da magnetita, Fe_3O_4 , que são instáveis e se oxidam facilmente em meio ácido ou em contato com o ar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A torta de soja utilizada foi gentilmente doada pela Imcopa (Cambé-PR, Brasil).

O Celite 345[®], utilizado como suporte e o palmitato de *p*-nitrofenila, utilizado como substrato para a atividade hidrolítica de lipase, foram adquiridos de Sigma-Aldrich (EUA).

As nanopartículas foram sintetizadas utilizando borohidreto de sódio P.S. (NaBH₄) adquirido de Sigma-Aldrich e cloreto de cobalto (II) P.A. (CoCl₂.6H₂O) (OSO) adquirido de Dinâmica.

Para as reações de hidrólise foram utilizados óleo de soja e entrada da trans da empresa BSBIOS.

Os demais reagentes utilizados foram de grau analítico.

4.1.1 Meios de Cultivo

Os meios de cultivo utilizados no decorrer deste trabalho foram o meio BDA (Tabela 1) e meio VGA (Tabela 2) que utiliza em sua composição o meio mínimo de sais de Vogel (1956) (Tabela 3), como descrito a seguir:

Tabela 1 - Meio BDA (Batata Dextrose Agar)

Batata	20 g
Dextrose	2 g
Ágar	1,5 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: Próprio autor (2019)

Tabela 2 - Meio VGA (Vogel, Glucose e Ágar)

Meio mínimo de sais de Vogel	2 mL
Glucose	1 g
Ágar	2 g
Água destilada qsp	100 mL

Fonte: Próprio autor (2019)

Tabela 3 - Meio mínimo de sais de Vogel concentrado 50 vezes

		Solução de elementos-traços	
Citrato de sódio. 5½.H ₂ O	150 g	Ácido cítrico.1.H ₂ O	5 g
KH ₂ PO ₄ anidro	250 g	ZnSO ₄ .7.H ₂ O	5 g
NH ₄ NO ₃ anidro	100 g	Fe(NH ₄) ₂ .6H ₂ O	1 g
MgSO ₄ .7.H ₂ O	10 g	CuSO ₄ .5.H ₂ O	0,25 g
CaCl ₂ .2.H ₂ O	5 g	MnSO ₄ .1.H ₂ O	0,05 g
Solução de elementos-traços	5 mL	H ₃ BO ₃ anidro	0,05 g
Solução de biotina 0,1 mg/mL	2,5 mL	NaMoO ₄ .2.H ₂ O	0,05 g
Água destilada qsp.	1000 mL	Água destilada qsp.	100 mL

Fonte: Próprio autor (2019)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Produção de inóculo e obtenção de lipases

O micro-organismo utilizado foi o *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308), mantido em BDA inclinado a 4 °C ± 2 °C e repicado trimestralmente. *B. ribis* EC-01 foi transferido do meio de manutenção para placas de *Petri* contendo meio mínimo de sais de Vogel (VOGEL, 1956), glucose 1 % (m/v) e ágar 2 % (m/v) que foram incubadas a 28 ± 2 °C por 5 dias (Figura 5).

Após o tempo de crescimento, quatro esferas de 0,7 cm de diâmetro foram cortadas e usadas para inocular frascos *Erlenmeyer* de 125 mL, contendo 25 mL de meio composto por 2,4% de torta de soja (m/v) e 4,5 % de glicerol (v/v). Os cultivos foram mantidos sob agitação, em *shaker* (180 rpm) por 5 dias a 28 ± 2°C, e interrompidos por centrifugação (5000 rpm/15 min). Os extratos brutos livres de células foram tratados com (NH₄)₂SO₄, dialisados com água deionizada e armazenados a 4°C e para serem utilizados como fonte de lipases.

Figura 5 - *Botryosphaeria ribis* EC-01 crescido em VGA após 5 dias de cultivo a 28 ± 2 °C



Fonte: Próprio autor (2019)

4.2.2 Determinação da atividade de lipase livre e imobilizada

A atividade da lipase livre e imobilizada foi determinada utilizando palmitato de *p*-nitrofenila (*p*NPP) como substrato (WINKLER; STUKMANN, 1979), baseado na hidrólise do *p*NPP, em meio aquoso, contendo Triton X-100 como surfactante. A liberação *p*-nitrofenol pela ação da lipase é quantificada por meio da absorvância da coloração amarela no comprimento de onda de 410 nm.

A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 8) a 55 °C por 2 minutos (MESSIAS et al., 2009). O coeficiente de extinção molar para o *p*NP ($1,5\times 10^4$ M⁻¹ cm⁻¹) foi utilizado para correlacionar a concentração do produto com a absorvância obtida na leitura a 410 nm. Uma unidade de atividade de lipase foi definida como 1 μmol de *p*NP (*p*nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima.

O procedimento e o cálculo utilizado para a determinação da atividade estão descritos abaixo:

- Solução A: palmitato de *p*-nitrofenila (ou outros ésteres de *p*-nitrofenila) em isopropanol, em uma concentração de 3,0 mg.mL⁻¹;
- Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão fosfato 0,05 M, pH 8,0.

1 mL da solução A foi adicionada em 10 mL da solução B. A mistura reativa foi produzida, imediatamente à determinação da atividade, considerando que o substrato é instável. Em banho termostatizado na temperatura ótima de 55 °C para a atividade da lipase, 0,9 mL da mistura foi adicionado em tubo de ensaio e em seguida, 0,1 mL do extrato enzimático também foi adicionado. Para o controle da reação foi utilizado 0,1 mL de água destilada, no lugar do extrato enzimático. Decorrido dois minutos de reação, a leitura da atividade foi efetuada a 410 nm.

Para medir a atividade da enzima imobilizada utilizou-se aproximadamente 1mg da mesma, em incubação com agitação, também a 55 °C e interrupção por banho de gelo. Para cada análise realizou-se um controle utilizando 1mg do suporte.

O cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada foi realizado a partir da fórmula geral (1):

$$\frac{U}{mL} \text{ ou } \frac{U}{g} = \frac{Abs}{\varepsilon} \times \frac{1}{V_e \text{ ou } m_e/V_{sol}} \times \frac{1}{t_r} \times DF \times 10^3 \quad (1)$$

Em que:

- $U.mL^{-1}$: unidade de atividade enzimática da solução da enzima, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;
- $U.g^{-1}$: unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;
- Abs: absorvância a λ (nm);
- ε : coeficiente de extinção molar ($M^{-1}.cm^{-1}$);
- V_e : volume de enzima utilizado no ensaio (mL);
- V_{sol} : volume utilizado para a reação com a enzima imobilizada (mL);
- m_e : massa da enzima utilizada no ensaio (g)
- t_r : tempo de reação (minutos);
- DF: fator de diluição
- 10^3 : fator de conversão de $mol.L^{-1}$ para $\mu mol.mL^{-1}$.

O procedimento de quantificação da atividade de lipase descrito acima foi adotado como a condição padrão de análise de atividade enzimática.

4.2.3 Produção das nanopartículas magnéticas de cobalto

Considerando a proporção 1:7 mol:mol de $\text{CoCl}_2:\text{NaBH}_4$, pesou-se 0,5000 g de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 0,5564 g de NaBH_4 .

Para a incorporação de Celite, considerou-se a proporção 1:1 (m/m), em relação a massa de $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ pesando, assim, 0,5 g de Celite.

Logo em seguida, os compostos foram macerados por aproximadamente 5 minutos em um almofariz de ágata até a obtenção de um pó preto (Figura 6 e 7).

Figura 6 – Nanopartículas de cobalto antes da lavagem



Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 7 - Nanopartículas de cobalto incorporadas a celite antes da lavagem



Fonte: Próprio autor (2019)

Após a maceração, o produto obtido foi transferido para dois tubos de ensaio de plástico de 14 mL, aos quais adicionou-se água destilada lentamente até que parassem de efervescer.

Os tubos foram completados com água destilada até atingir 12 mL e levados à centrífuga (6000 rpm) durante 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e esta operação foi repetida até que atingisse pH neutro.

Terminado o processo de lavagem, o produto final foi seco a vácuo.

4.2.4 Imobilização da Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 de Acordo com Planejamentos Fatoriais

A imobilização da Lipase de *B. ribis* EC-01 foi realizada em nanopartículas magnéticas de cobalto com e sem celite.

A partir da lipase concentrada preparou-se uma solução enzimática (~ 24 U.mL⁻¹) em tampão fosfato 0,05 M, pH 8 que foi utilizada para imobilização nos suportes de nanopartículas magnéticas.

O suporte (100 mg) foi deixado em contato com 5 mL de solução enzimática ($\sim 24,5$ U.mL⁻¹) em tampão fosfato (0,05 M, pH 8) sob agitação a 150 rpm, de acordo com planejamento fatorial 2² (22 experimentos com pontos axiais), avaliando-se temperatura (10 – 30°C) e tempo de contato (45 – 345 min) com os níveis inferiores (-1), centrais (0) e superiores (+1), além dos axiais ($\pm 1,41$). Para cada variável

independente a atividade enzimática foi determinada no derivado, no sobrenadante da filtração e na solução inicial de enzima.

Tabela 4 – Planejamento Fatorial

Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Variáveis codificadas	-1,41	-1	0	1	1,41
X_1 (tempo, min)	45	90	195	300	345
X_2 (temperatura, °C)	10	13	20	27	30

Fonte: Próprio autor (2019)

A enzima imobilizada foi lavada duas vezes com tampão fosfato pH 8 (0,2 M), seguido de lavagem com água destilada e seca sob vácuo.

Os resultados experimentais dos planejamentos fatoriais desenvolvidos foram ajustados em uma equação polinomial (2) pela técnica de regressão múltipla, onde Y é a resposta preditiva de atividade de lipase, sendo uma variável dependente, x_i e x_j são variáveis independentes codificadas e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} são coeficientes constantes.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=j}^k \beta_{ii} x_i x_j + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

As equações polinomiais quadráticas foram ajustadas para correlacionar as variáveis e a resposta. Os coeficientes de regressão (R^2) foram utilizados para expressar a qualidade do ajuste dos modelos polinomiais e a significância estatística foi determinada pelo teste-F.

Análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 10 % de significância utilizando o programa STATISTICA Version 8.0[®].

4.2.5 Caracterização dos suportes por Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de infravermelho das nanopartículas magnéticas com o sem celite, antes e após imobilização, foram obtidos através do espectrofotômetro Perkin-Elmer(R) modelo Vertex 70 acoplado ao acessório de Reflectância Total Atenuada

(ATR), utilizando 32 scans, resolução de espectro de 2 cm^{-1} e janela de trabalho entre 4000 cm^{-1} e 400 cm^{-1} .

4.2.6 Caracterização dos suportes por Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas magnéticas com o sem celite, antes e após imobilização, foram obtidas por microscópio eletrônico JEOL modelo JSM 7401F (FEG).

4.2.7 Produção de biodiesel

A produção de ésteres de biodiesel foi realizada em duas etapas: hidrólise e esterificação, partindo dos produtos obtidos na primeira etapa.

4.2.7.1 Etapa 1: Hidrólise do óleo de soja e da entrada da trans

A hidrólise do óleo contendo sebo bovino foi realizada utilizando-se a razão 1:1 óleo:tampão fosfato pH 8 0,05 M (m/m), em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL, sob agitação em shaker, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 rpm, por 24 horas. Os experimentos foram feitos em duplicatas contendo 25g de óleo de soja + sebo bovino (entrada da trans), 25 g de tampão fosfato e 0,5 g de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas de cobalto com celite (NPS+CE).

O óleo de soja foi hidrolisado utilizando-se a razão 1:1 óleo:água destilada (m/m), em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL, sob agitação em shaker, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, 180 rpm, por 24 horas. Os experimentos foram realizados em duplicatas, contendo 25g de óleo de soja, 25 g de água destilada e 0,5 g de enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas de cobalto sem celite (NPS).

Após o tempo decorrido, as misturas existentes nos *Erlenmeyers* foram separadas em funil de separação em duas fases: uma fase gordurosa contendo ácidos graxos, mono-, di- e triacilgliceróis não reagidos e uma fase aquosa contendo glicerol (Figura 8). A fase oleosa foi aquecida para evaporação da água residual, restando apenas os ácidos graxos, a fim de serem utilizados como matéria prima na produção de biodiesel por esterificação. A fase aquosa contendo glicerol também foi

aquecida para retirada da água e armazenada para posterior utilização na produção de enzimas.

A enzima imobilizada foi recuperada por filtração à vácuo e lavada com hexano para retirada do óleo residual e armazenada para reutilização. A recuperação não foi possível por aplicação de um campo magnético devido ao imã utilizado ser de baixa potência. Estudos futuros serão realizados com imã com maior capacidade de magnetismo.

Figura 8 - Separação de fases após hidrólise do óleo contendo sebo bovino utilizando nanopartículas de cobalto impregnadas em celite (direita) e nanopartículas de cobalto (esquerda)



Fonte: Próprio autor (2019)

A porção de ácidos graxos obtida foi quantificada e utilizada em uma proporção de 1:4 ácidos graxos:etanol na reação de esterificação (etapa 2). Da mesma forma, a lipase imobilizada recuperada do meio reacional de hidrólise foi pesada e utilizada em razão mássica 1:1 ácidos graxos:enzima na produção de ésteres.

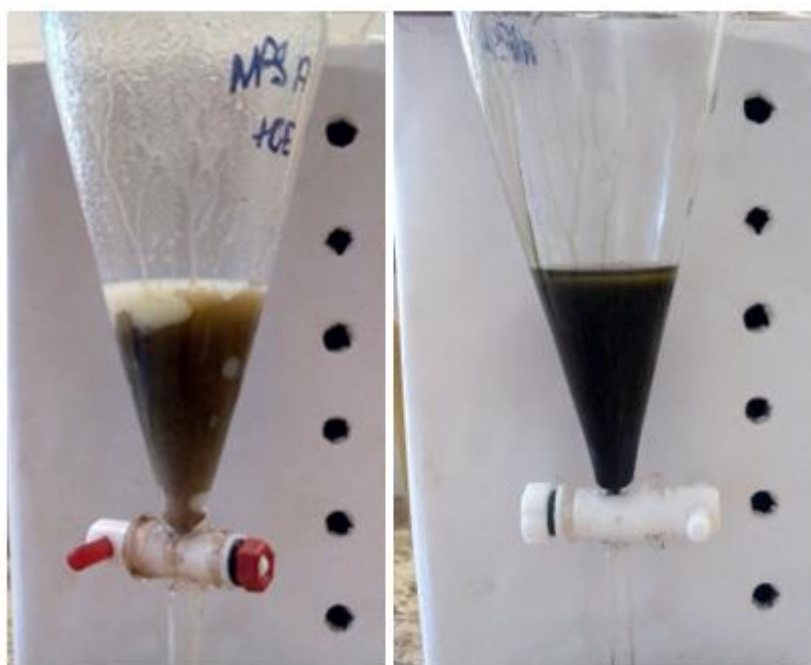
4.2.7.2 Etapa 2: Esterificação Enzimática

Para a reação de esterificação foi utilizada uma proporção de 1:3:1 ácidos graxos:etanol:enzima recuperada na etapa 1 em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL, sob agitação em shaker, a 40°C, 180 rpm, por 48 horas. As porções de etanol foram acrescentadas gradualmente à mistura em intervalos de 2 horas.

Ao final do experimento, a mistura de ésteres e compostos não reagidos presentes nos *Erlenmeyers* foi vertida em funil de separação. A fase superior contendo os ésteres de ácidos graxos foi diluída em hexano para melhor separação do catalisador (Figura 9), enquanto a fase inferior continha água, álcool não reagido, podendo conter, também, glicerol proveniente de reação de transesterificação.

O biocatalisador foi recuperado por filtração a vácuo e lavado para retirada de resíduos.

Figura 9 - Separação de fases após esterificação utilizando nanopartículas de cobalto impregnadas em celite (direita) e nanopartículas de cobalto (esquerda) recuperadas na etapa 1



Fonte: Próprio autor (2019)

4.2.8 Determinação do Índice de Acidez

Os ácidos graxos e ésteres obtidos a partir das reações de hidrólise e esterificação, respectivamente, foram titulados em duplicatas contendo cerca de 0,025 g das amostras de óleo, ácidos graxos e ésteres de biodiesel e 50 mL de metanol, com solução de hidróxido de potássio $0,01 \text{ mol.L}^{-1}$ e 5 gotas de fenolftaleína a 1% como indicador. Os valores de acidez foram calculados pela Equação 3.

$$IA \text{ (mgKOH/g)} = V \times f \times M \times 56,1 \div P \quad (3)$$

Em que:

V = volume da solução de KOH gasto na titulação (mL)

f = fator de correção da solução padrão de KOH

P = massa de amostra (g)

4.2.9 Análise dos ésteres por Cromatografia gasosa

Os ésteres etílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás CGShimadzu-GC2010-plus acoplado a um MS-QP2010-Ultra também Shimadzu, equipado com uma coluna Restek RT-2560 de 100 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 micro de espessura de filme. As vazões dos gases foram de $1,4 \text{ mL.min}^{-1}$ para o gás de arraste (He).

A razão de divisão da amostra (*split*) foi de 1/50 com fluxo de purga de $3,0 \text{ mL.min}^{-1}$ e as temperaturas do injetor e detector foram 200 e 230°C, respectivamente. A rampa de temperatura da coluna foi de 190°C durante 1min, elevando a temperatura para 200°C a taxa de $1.5^\circ\text{C.min}^{-1}$ e mantendo a 200°C por 2 min, em seguida elevou-se a temperatura para 230 °C na taxa de $1.5^\circ\text{C.min}^{-1}$ e mantido a 230°C durante 12 min. As áreas dos picos foram determinadas pelo *software Star* (Varian).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PRODUÇÃO DE INÓCULO E OBTENÇÃO DE LIPASES

A lipase de *B. ribis* EC-01 foi produzida em condição previamente otimizada por Andrade et al. (2013) que utiliza 2,4% (m/v) de torta de soja e 4,5% (v/v) de glicerol PA. A Tabela 1 apresenta os resultados de atividade obtidos antes e após o tratamento com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e também após a diálise contra água deionizada.

Tabela 5 - Produção de lipases por *Botryosphaeria ribis* EC-01 antes e após concentração e diálise

Amostra	U/mL
Extrato bruto	33,3 ± 0,27
Lipase após concentração (20%, m/v $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)	302 ± 20,9
Lipase após concentração e diálise	322 ± 8,90

Fonte: Próprio autor (2019)

O resultado do extrato bruto obtido (33,3 U/mL) não foi satisfatório, levando em conta o valor predito apontado pelo modelo para esta condição que é de 72 U/mL (ANDRADE et al, 2013). Entretanto, após concentração com 20% (m/v) de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ocorreu o aumento de quase 10 vezes esse valor, resultando em uma atividade de 322 U/mL após a diálise, demonstrando que o processo de concentração foi eficiente.

5.2 PRODUÇÃO DO SUPORTES

As figuras 10 e 11 ilustram o resultado da aplicação de campo magnético sobre as NPS produzidas, demonstrando que o óxido de cobalto (Co_3O_4) foi sintetizado.

Figura 10 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas magnéticas de cobalto sem celite



Fonte: Próprio autor (2019)

Figura 11 - Aplicação de campo magnético nas nanopartículas de cobalto com celite



Fonte: Próprio autor (2019)

5.3 AVALIAÇÃO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *BOTRYOSPHERA RIBIS* EC-01 DE ACORDO COM PLANEJAMENTOS FATORIAIS

A imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas (NPS) e em nanopartículas magnéticas impregnadas em celite (NPS+CE) foram realizadas de acordo com planejamentos fatoriais 2^2 com pontos axiais e triplicata no ponto central.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos com a imobilização de lipases em NPS+CE. A atividade enzimática variou de 134 a 711 U/g_{NPS+CE}, sendo o valor máximo encontrado quando tempo (X_1) era de 90 min e a temperatura (X_2) igual a 27°C.

Tabela 6 - Planejamento fatorial para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas impregnadas em celite (NPS+CE)

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas
	X_1	X_2	U/g _{NPS+CE}
1	-1	-1	499
2	-1	1	711
3	1	-1	578
4	1	1	399
5	-1,41	0	574
6	1,41	0	329
7	0	-1,41	134
8	0	1,41	564
9	0	0	165
10	0	0	334
11	0	0	270

Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X_1 (tempo, min)	45	90	195	300	345
X_2 (temperatura, °C)	10	13	20	27	30

Fonte: Próprio autor (2019)

A análise de variância do modelo está apresentada na Tabela 7 e exibe que $F_{\text{calc}} > F_{\text{list}}$ nos graus de liberdade correspondentes à imobilização de lipases no suporte. O valor F comprova que existe significância do modelo, apesar do R^2 ser de 0,71.

Neste modelo quadrático somente a variável tempo (X_1 , em negrito) foi significativa no nível de 90% ($p \leq 0,10$, $R^2 = 0,71$), mostrada na Equação 4. O modelo preditivo mostra que com a temperatura (X_2) em 34 °C e tempo (X_1) de 27 minutos a

resposta seria de 1527 U/g_{NPS+CE}, evidenciando os ótimos resultados que podem ser alcançados utilizando este suporte.

$$U/g_{NPS+CE} = 256,2 - 2,616 X_1 + 135,1 X_1^2 + 80,09 X_2 + 83,45 X_2^2 - 97,89 X_1 X_2 \quad (4)$$

Tabela 7 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2² para a imobilização de lipase em celite impregnado com nanopartículas magnéticas (U/g_{NPS+CE}).

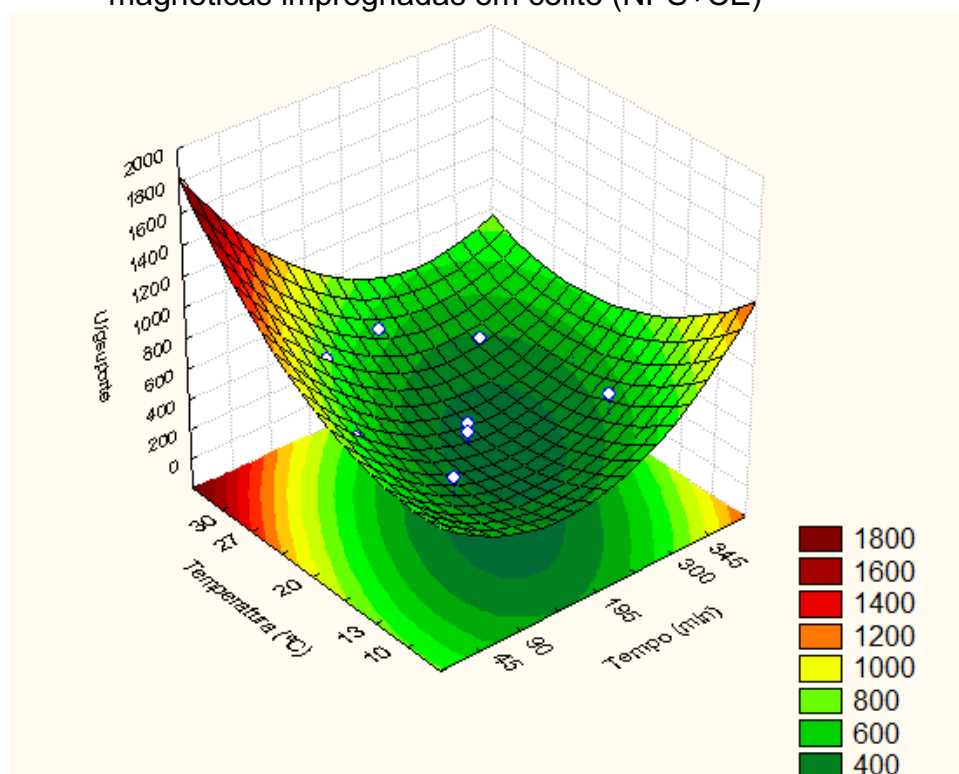
Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F _{calc} ^a	F _{list}
U/g _{NPS+CE}	Modelo	245689,6	1	245689,6	22,1	3,36
	Resíduo	100134,0	9	11126		
	Total	345823,6	10			

$$R^2 = 0,71 \quad {}^a F 90\%.1,9$$

Fonte: Próprio autor (2019)

O diagrama de contorno gerado a partir do ajuste do modelo está apresentado na Figura 12 e indica a influência das variáveis tempo e temperatura na imobilização de lipases neste suporte.

Figura 12 – Superfície de resposta para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas impregnadas em celite (NPS+CE)



Fonte: Próprio autor (2019)

Como pode ser observado na Figura 10 o aumento da temperatura favorece a imobilização de lipases neste suporte, como por exemplo a 30 °C e tempo de 45 minutos atividade próxima a 1400 U/g_{NPS+CE} pode ser obtida, de acordo com o modelo preditivo. Também é visível a influência do tempo, sendo que maiores atividades enzimáticas foram obtidas no modelo com tempos inferiores a 45 minutos.

A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos na imobilização de lipases em NPS de acordo com o planejamento 2² com pontos axiais e triplicata no ponto central. A imobilização variou de 46,6 a 495 U/g_{NPS}, sendo que este último valor foi alcançado quando tempo (X_1) era de 45 minutos e a temperatura (X_2) indicava 20 °C.

Tabela 8 - Planejamento fatorial para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas (NPS)

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas			
	X_1	X_2	U/g _{NPS}			
1	-1	-1	159			
2	-1	1	178			
3	1	-1	46,6			
4	1	1	104			
5	-1,41	0	495			
6	1,41	0	103			
7	0	-1,41	56,2			
8	0	1,41	211			
9	0	0	125			
10	0	0	123			
11	0	0	106			
Fatores		Níveis reais				
		-1,41	-1	0	1	1,41
X_1 (tempo, min)		45	90	195	300	345
X_2 (temperatura, °C)		10	13	20	27	30

Fonte: Próprio autor (2019)

O modelo quadrático está apresentado na Tabela 9 e mostra que $F_{\text{calc}} > F_{\text{list}}$ nos graus de liberdade correspondentes à imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas em U/g_{NPS}. O valor F e o coeficiente de regressão (R^2) mostraram que o modelo ajustado teve boa capacidade preditiva e é estatisticamente válido.

Tabela 9 - Análise de variância (ANOVA) para o planejamento fatorial 2^2 para a imobilização de lipase em nanopartículas magnéticas de cobalto (U/g_{NPS}).

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F_{calc}^a	F_{list}
U/g_{NPS}	Modelo	113263,9	1	113263,9	27,1	3,36
	Resíduo	37688,3	9	4187,6		
	Total	150952,2	10			

$$R^2 = 0,75 \quad {}^aF_{90\%} 1,9$$

Fonte: Próprio autor (2019)

A superfície de resposta obtida para este modelo preditivo está apresentada na Figura 13 e indica que em tempos inferiores a 90 minutos e qualquer temperatura apresentariam os melhores resultados de imobilização, com respostas superiores a 500 U/g_{NPS} . Entretanto, acima de 195 minutos é possível observar que altas temperaturas favorecem a imobilização neste suporte.

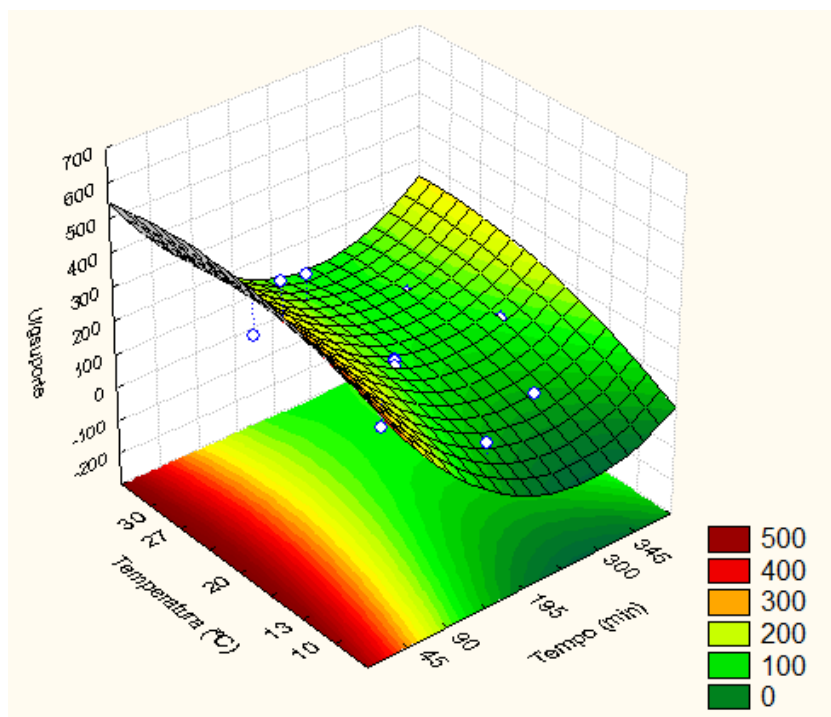
A explicação desse fato pode ser devido à dessorção da enzima do suporte, já que o método de imobilização (adsorção) envolve forças fracas de interação. Com o aumento do tempo de imobilização, a enzima que possivelmente é dessorvida do suporte, com a diminuição da energia cinética da reação proporcionada pelas baixas temperaturas, pode ser adsorvida novamente ao suporte. De qualquer maneira, melhores resultados podem ser obtidos com tempos de reação menores, pois diminui a possibilidade de dessorção da enzima do suporte.

A Equação 5 preditiva para este modelo quadrático é mostrada abaixo e demonstra que somente a variável tempo (X_1 , em negrito) foi significativa no nível de 90% ($p \leq 0,10$, $R^2 = 0,75$).

$$U/g_{NPS} = 118,3 - 92,91X_1 + 67,25X_1^2 + 36,90 X_2 - 16,20X_2^2 + 9,624 X_1X_2 \quad (5)$$

Planejamentos fatoriais e metodologia de superfície de resposta são ferramentas úteis para otimizar um processo, pois reduzem o número de experimentos. Diversos autores têm utilizado essas ferramentas a fim de otimizar a imobilização de enzimas, manipulando os fatores envolvidos, geralmente tempo, temperatura e concentração de enzima (CHAIBAKHSH et al., 2012; KISHORE et al., 2012; OSHO et al., 2016; DONG et al., 2019).

Figura 13 - Superfície de contorno para a imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas (NPS)



Fonte: Próprio autor (2019)

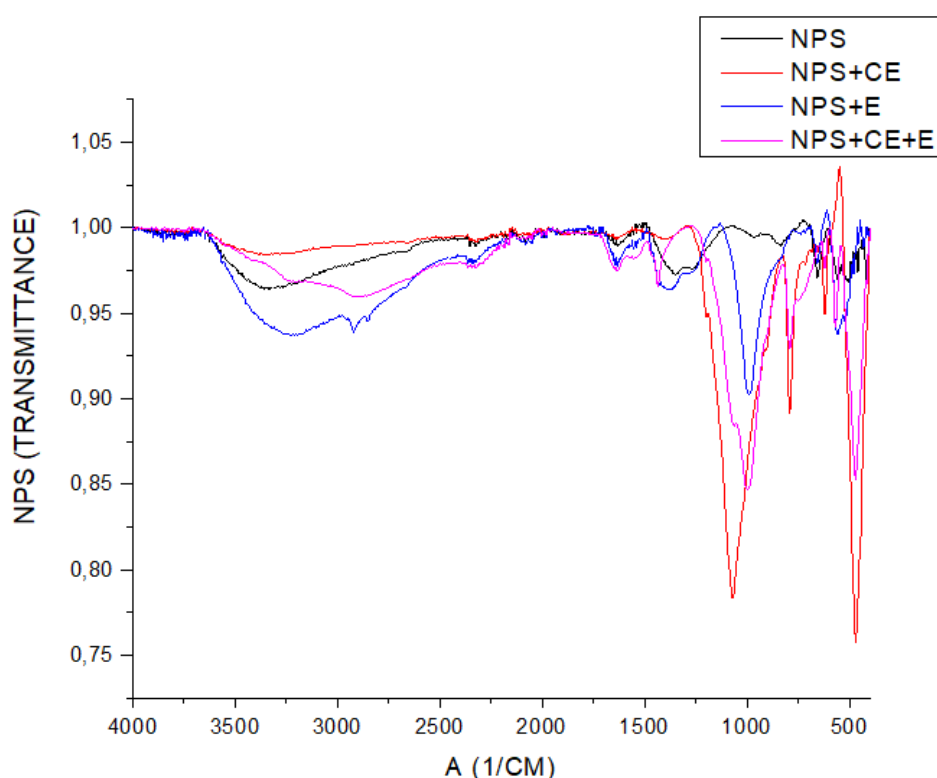
Enzimas de diversos microorganismos foram imobilizadas em suportes magnéticos. Uma lactase comercial de *Aspergillus oryzae* foi imobilizada em magnetita ativada com polietilenoimina e reticulada com glutaraldeído com máxima atividade de 360 U/g_{suporte} (DEKKER, 1989). Uma quitosana magnética a partir de Fe₃O₄ foi utilizada para imobilizar a lipase *Candida rugosa* covalentemente utilizando agentes de ativação como EDC e NHS. A metodologia de superfície de resposta foi utilizada e o máximo de atividade de lipase foi 20 U/g_{suporte} (KUO et al., 2012).

Os resultados encontrados com a imobilização da lipase de *B. ribis* EC-01 em ambos suportes fabricados neste trabalho foram superiores aos relatados acima. Estes biocatalisadores se demonstraram promissores para aplicações.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POR ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

As amostras de nanopartículas magnéticas de cobalto (NPS), nanopartículas magnéticas de cobalto incorporadas a celite (NPS+CE) e enzimas imobilizadas nos suportes (NPS+E, NPS+CE+E) foram analisadas por espectroscopia de infravermelho (Figura 14).

Figura 14 - Espectro FTIR das nanopartículas magnéticas antes e após imobilização



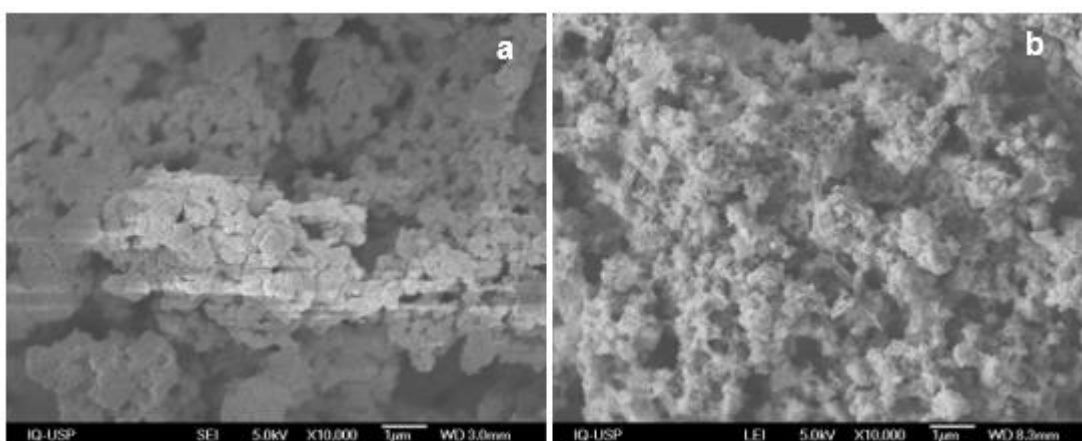
Fonte: Próprio autor (2019)

As bandas características das ligações entre Co e O não são vistas pelo espectro. Os picos presentes entre 1100 cm^{-1} e 490 cm^{-1} são típicos das vibrações das ligações Si–O–Si e Si-OH da Celite. O espectro de FTIR da lipase adsorvida em NPS+CE apresenta um pico localizado em aproximadamente 1000 cm^{-1} referente a um estiramento assimétrico da ligação Si–O–Si da Celite, que foi deslocado devido a presença da enzima. Quando comparamos o gráfico das NPS+E com o gráfico das NPS+CE+E, notamos a presença do pico em 500 cm^{-1} que se refere às ligações da enzima com o suporte.

5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A Figura 15 ilustra a morfologia das nanopartículas magnéticas de cobalto antes e após a imobilização com a lipase de *B. ribis* EC-01. Como pode ser observado, o material se organiza em aglomerados esféricos irregulares nanométricos (Fig 15a). Após a imobilização da enzima nota-se aumento do tamanho destes aglomerados possivelmente pela interação com moléculas de enzima (Fig 15b). É possível observar não só o aumento do tamanho mas também alterações na rugosidade da superfície, indicando que a enzima está mesmo imobilizada no material.

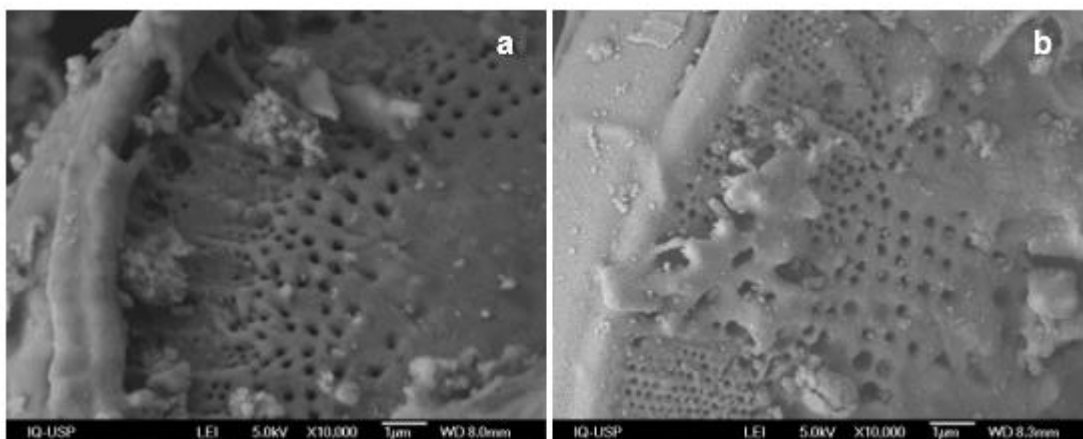
Figura 15 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas magnéticas de cobalto antes (a) e após (b) a imobilização de lipases



Fonte: Próprio autor (2019)

A Figura 16 apresenta a superfície da celite impregnada com partículas magnéticas antes (Fig 16a) e após (Fig 16b) a imobilização de lipases. Nas figuras abaixo é possível notar a superfície irregular deste material. Na Figura 16a os aglomerados de nanopartículas magnéticas aparecem na superfície do material e após a imobilização estes aglomerados são recobertos com possíveis aglomerados da enzima, assim como a superfície do celite (Fig 16b).

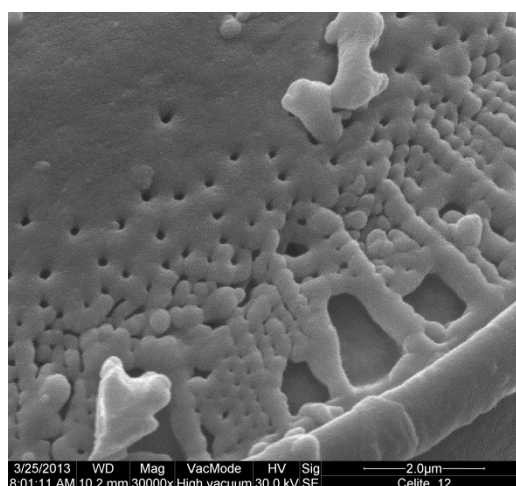
Figura 16 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas magnéticas de cobalto impregnadas em celite antes (a) e após (b) a imobilização de lipases



Fonte: Próprio autor (2019)

Após a incorporação das partículas magnéticas verifica-se alteração na superfície do celite, comparando-se com a superfície do material sem modificação, mostrada na Figura 17.

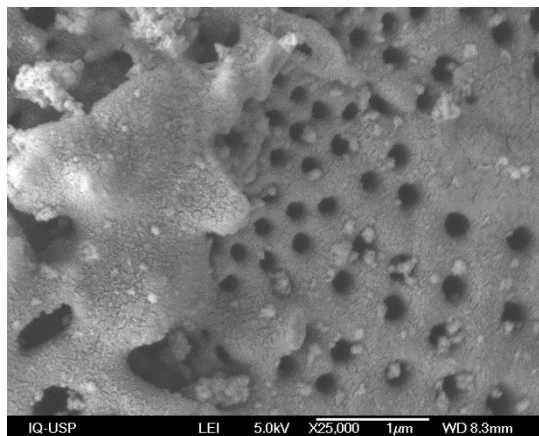
Figura 17 - Micrografia obtida da superfície do celite



Fonte: Andrade (2013)

Na Figura 18 com maior aumento é possível verificar a ocorrência relatada acima, onde nanopartículas e celite são recobertos por aglomerados enzimáticos, sugerindo que maior quantidade de enzima pode ser adsorvida neste material.

Figura 18 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das nanopartículas magnéticas de cobalto impregnadas em celite após a imobilização de lipases

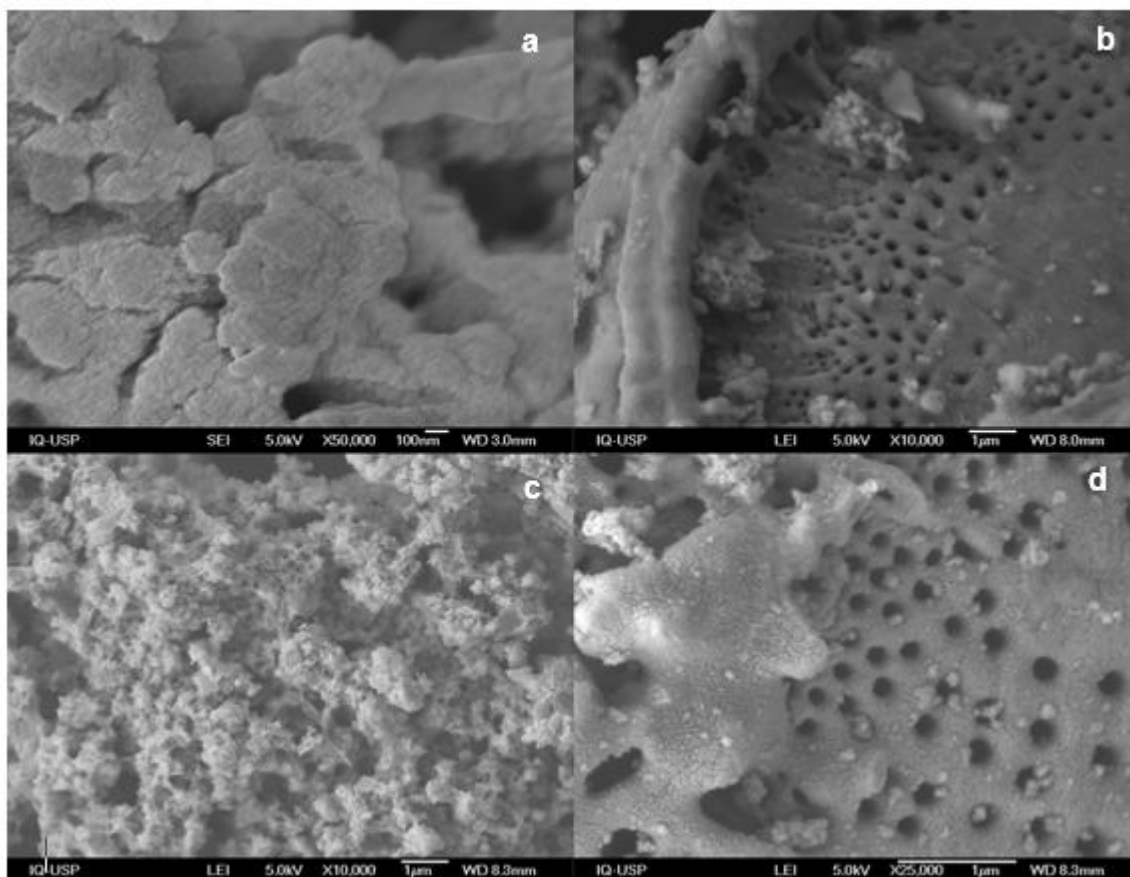


Fonte: Próprio Autor (2019)

Na Figura 19 encontra-se uma comparação dos resultados de imobilização obtidos nos dois materiais. As Figuras 19a e 19b mostram as nanopartículas magnéticas e as nanopartículas magnéticas incorporadas ao celite, respectivamente.

Após a imobilização da enzima nas nanopartículas magnéticas (Figura 19c) e nas nanopartículas magnéticas impregnadas em celite (Figura 19d) nota-se aumento da rugosidade, principalmente sobre as nanopartículas, sugerindo que a enzima foi imobilizada. Verifica-se também um padrão de aglomerados que se repete nos dois suportes que já foi notado em outros trabalhos (CHARUCHINDA et al., 2012; MOHAMED et al., 2017), característico de enzimas. As enzimas são polímeros de aminoácidos, portanto, íons dipolares (carga positiva do grupo amino e carga negativa do grupo carboxílico), essa característica pode fazer com que ambas as partes da molécula de enzima façam parte da interação com o suporte, originando este padrão observado.

Figura 19 - Micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura dos materiais obtidos antes (a e b) e após (c e d) a imobilização de lipases



Fonte: Próprio autor (2019)

5.6 DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE ACIDEZ

A Tabela 10 apresenta os resultados obtidos nas análises de índice de acidez das matérias-primas e dos produtos formados na hidrólise e esterificação.

Tabela 10 - Índice de acidez dos óleos utilizados antes da utilização, após a hidrólise e após a esterificação.

Ensaio	Matéria-prima	Índice de acidez (mg/g _{KOH})	
		Hidrólise	Esterificação
NPS A	0,65 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,64 ± 0,03
NPS B	0,65 ± 0,00	0,64 ± 0,00	0,64 ± 0,00
NPS+CE A	0,60 ± 0,05	0,67 ± 0,01	0,64 ± 0,04
NPS+CE B	0,60 ± 0,05	0,59 ± 0,02	0,60 ± 0,01

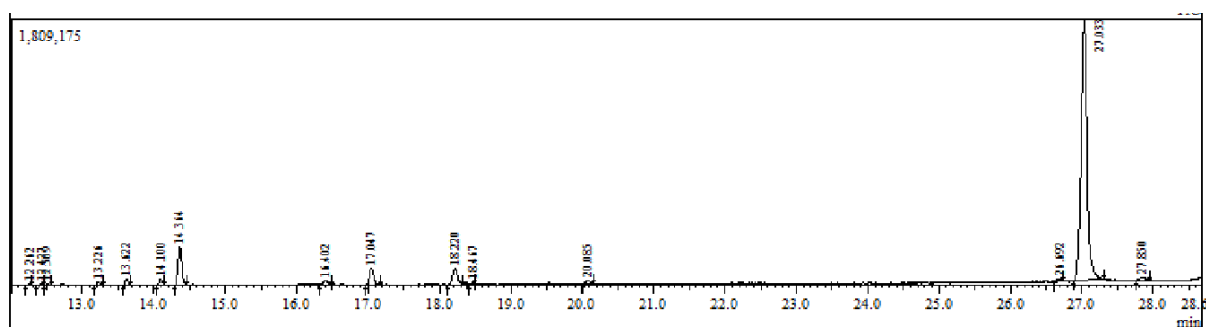
Fonte: Próprio Autor (2019)

Aparentemente o biocatalisador NPS no ensaio A e NPS+CE no ensaio B obtiveram as maiores variações nos índices de acidez durante o processo. Para o biocatalisador NPS a hidrólise foi efetiva pelo aumento de acidez do produto que passou de 0,65 para 0,68 mg/g_{KOH}, evidenciando que os triacilgliceróis contidos no óleo de soja foram hidrolisados parcialmente a ácidos graxos. Após a esterificação este índice caiu para 0,64 mg/g_{KOH}, sugerindo que os ácidos graxos foram esterificados. Este mesmo comportamento foi notado com o biocatalisador NPS+CE no ensaio A, que ao ser hidrolisado, o índice de acidez da matéria prima aumentou de 0,60 para 0,67 e caiu para 0,64 mg/g_{KOH} após a esterificação. Nos outros ensaios pouca alteração ou nenhuma foi notada nas amostras.

5.7 ANÁLISE DOS ÉSTERES POR CROMATOGRAFIA GASOSA.

Os produtos de esterificação foram analisados por Cromatografia Gasosa. A Figura 21 exemplica um dos cromatogramas obtidos. É possível notar a presença de diversos ésteres etílicos de ácidos graxos, como o palmítico (C16:0) em 14,4 minutos, o esteárico (C18:0) em 17 minutos, oleico (C18:1) em 18,2 minutos e o linoleico (C18:2) em 20,1 minutos, característicos do óleo de soja.

Figura 20 - Cromatograma obtido na reação de hidroesterificação utilizando lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas de cobalto



Fonte: Próprio autor (2019)

Entretanto, quando analisado o rendimento total de conversão em ésteres de somente 20% foi detectado nesta amostra, o que fica evidente quando comparado ao pico do padrão em 27 minutos.

As demais amostras analisadas tiveram conversão de 17% em ésteres, somente. Com estes resultados pode-se verificar que o biocatalisador é eficiente para as reações de hidrólise e esterificação para conversão de óleo de soja em ésteres de biodiesel. Entretanto, estudos são necessários para verificar se algum reagente envolvido no processo, de certa forma, prejudica a ação das enzimas e, conseqüentemente aumentar a conversão em ésteres.

6 CONCLUSÃO

Os suportes com nanopartículas magnéticas de cobalto foram produzidos de forma eficiente, comprovados pela notável capacidade magnética.

A enzima imobilizada nestes suportes apresentou altos títulos de atividade, sendo que o modelo preditivo proposto para a enzima imobilizada em nanopartículas contendo celite apontou que uma atividade de 1527 U/g_{NPS+CE} pode ser alcançada utilizando a temperatura de 34 °C e tempo de 27 minutos.

As análises morfológicas do material sugerem que as enzimas imobilizadas formam aglomerados, principalmente com as nanopartículas. As análises de infravermelho demonstraram as bandas características do material celite e da enzima, evidenciando que a enzima está imobilizada.

O biocatalisador produzido a partir de nanopartículas de cobalto proporcionou a melhor conversão em ésteres (20%), evidenciado também pelo ensaio de índice de acidez.

Este trabalho mostrou que ambos os suportes são adequados para imobilizar lipases e ser aplicados na reação de hidroesterificação. Entretanto, o estudo mais aprofundado do mecanismo de catálise se mostrou necessário, a fim de aumentar a conversão em ésteres.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. M.; et. al. Lipase production by *botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: optimization. Immobilization and application for biodiesel production. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 170, p. 1792-1806, 2013.

ANDRADE, M. M.; et.al. Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean Meal Supplemented with Amino Acids, and Some Physicochemical Properties of the Enzyme. **The Electronic Journal of Chemistry**. v.16, n.3, p. 169-177, 2014.

ANDRADE, M. M. **Produção e imobilização da lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 e aplicações**. 2013. 208p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

BARBOSA, A.M.; et al. Soybean oil and meal as substrates for lipase production by *Botryosphaeria ribis*, and soybean oil to enhance the production of Botryosphaeran by *Botryosphaeria rhodina*. **Soybean, Biochemistry, Chemistry and Physiology**, p. 101-118, 2011.

BILAL, M., et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530–2544, 2018.

BORK, J. A.; et. al. **Síntese e imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em nanopartículas magnéticas modificadas com moléculas de lauril sulfato**. COBEQ, Florianopolis, 2014.

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, p. 54, 1976.

CHAIBAKHSH, N.; et al. Response Surface Modeling and Optimization of Immobilized *Candida antarctica* Lipase Catalyzed Production of Dicarboxylic Acid Ester. **Chemical Product and Process Modeling**, v. 7, iss. 1, art. 2, 2012.

CHARUCHINDA, S.; SUTHIANTHONG, P.; CHULALAKSANANUKUL, W. Immobilization of Lipase onto *Cyperus Papyrus* L. for Biodiesel Production by

Transesterification and Hydrolysis-Esterification. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v. 21, n.1 p.127-133, 2011.

COSTA, V.M.; et al. **Produção de isoniazida por biocatálise usando lipase do tipo B de *Candida antarctica* imobilizada em nanopartículas magnéticas**. COBEQ, Florianópolis, 2014.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497–520, 2014.

CUNHA, M. A. A.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C. e DEKKER, R. F. H. **Journal of Basic Microbiology**, v. 43, p. 385, 2003.

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

DEKKER, R. F. H. Immobilization of a Lactase onto a Magnetic Support by Covalent Attachment to Polyethyleneimine-Glutaraidehyde-Activated Magnetite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, p. 289-310, 1989.

DONG, Z.; et al. Preparation of Immobilized Lipase Based on Hollow Mesoporous Silica Spheres and Its Application in Ester Synthesis. **Molecules**, v. 24, p. 395, 2019.

GANDHI, N.N. Applications of lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 621-634, 1997.

GHOSH, P. K.; SAXENA, R. K.; GUPTA, R.; YADAV, R. P.; DAVIDSON, W. S. Microbial lipases: production and applications. **Science Progress**, v. 79, n. 2, p.119157, 1996.

GUBIN, S. P.. Introduction – Magnetic Oxides. Federal Republic Of Germany: Willeyvch Verlag Gmbh&co, p. 483, 2009.

JAEGER, K-E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390-397, 2002.

JAEGER, K-E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396, 1998.

JEGANNATHAN, K. R.; ABANG, S. Production of Biodiesel Using Immobilized Lipase - A Critical Review. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 28, p253–264, 2008.

KHAN, M. J.; KHAN, F. H.; HUSAIN, Q. Application of Immobilized *Ipomoea batata* β Amylase in the Saccharification of Starch. **Journal of Applied Biological Sciences**, v. 5, p. 33-39, 2011.

KISHORE, D.; et al. Immobilization of b-Galactosidase onto Functionalized Graphene Nano-sheets Using Response Surface Methodology and Its Analytical Applications. **PLoS ONE**, v. 7, iss. 7, 2012.

KUO, C. H.; et al. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe_3O_4 nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2538–2545, 2012.

MAHMOUD, K. Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 182-188, 2016.

MAKHLOUF, S. A. Structural, electrical and optical properties of Co_3O_4 nanoparticles. **Superlattices and Microstructures**, v. 64, p. 107–117, 2013.

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

MEDINA, B. **Síntese mecanoquímica e caracterização de óxidos magnéticos de ferro e cobalto recobertos com sílica**: estrutura tipo coreshell. 2017. 46p. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, 2017.

MEDINA, B.; et al. Solventless preparation of Fe_3O_4 and Co_3O_4 nanoparticles: A mechanochemical approach. **Materials Chemistry and Physics**, v. 226, p. 318–322, 2019.

MEHTA, A.; BODH, U.; GUPTA, R. Fungal lipases: a review. **Journal of Biotech Research**, v. 8, p. 58-77, 2017.

MESSIAS, J. M.; et. al. Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, p. 426, 2009.

MOHAMED, S. A.; et al. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 84–90, 2017.

MOHAMMED, L.; et al. Magnetic nanoparticles for environmental and biomedical applications: A review. **Particuology**, v. 30, p. 1–14, 2017.

OSHO, M. B.; et al. Response surface methodology for optimal immobilization of *Aspergillus niger* ATCC 1015 lipase by adsorption method. **International Journal of Biological Research**, v. 4, ed. 1, p. 56-63, 2016.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n 1, p. 93-99, 2006.

PASHANGEH, K. H.; et. al. Biochemical characterization and stability assessment of *Rhizopus oryzae* lipase covalently immobilized on amino-functionalized magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 300–307, 2017.

RAMACHANDRAN, S.; et. al. Oil cakes and their biotechnological applications – A review. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 2000-2009, 2007.

RAVEAU, B. Transition metal oxides: Promising functional materials. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 25, p. 1965–1969, 2005.

REBELO, L. P. **Imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em resolução cinética de álcoois secundários quirais**. 2009. 220p. (Dissertação de Mestrado) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2009.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 409-414, 2007.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, p. 97–103, 2003.

TAHER, H.; AL-ZUHAIR, S. Emerging Green Technologies for Biodiesel Production. **Emerging Green Technologies for Biodiesel Production**, chapter 9.

SARNO, M.; IULIANO, M.; POLICETTI, M.; CIAMBELLI, P. High activity and selectivity immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles for banana flavour synthesis. **Process Biochemistry**, v. 56, p. 98–108, 2017.

SCHERER, R.; OLIVEIRA, J. V.; PERGHER, S.; OLIVEIRA, D. Screening of Supports for Immobilization of Commercial Porcine Pancreatic Lipase. **Materials Research**, v. 14, n. 4, p. 483-492, 2011.

SHARMA, D.; SHARMA, B.; SHUKLA, A. K. Biotechnological approach of microbial lipase: a review. **Biotechnology**, v. 10, p. 23-40, 2011.

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

SILVA, G. S.; et al. Desempenho de diferentes lipases imobilizadas na síntese de biodiesel de óleo de palma. **Technology**, vol. 33, núm. 2, p. 197-203, 2011.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, p. 486-520, 2012.

TAVARES, A.S.; AMARAL, P.F.F.; FINOTELLI, P.V. **Imobilização de lipase com magnetita para a produção de biodiesel**. COBEQ, 2013. Vassouras - RJ, 2013.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for Neurospora. **Microbial Genetics Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WINKLER, U.K.; STUCKMANN, M. Glycogen, hyaluronate, and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, v. 138, p. 663-670, 1979.

ZAFAR, A; et al. Synthesis of fibrous and non-fibrous mesoporous silica magnetic yolk–shell microspheres as recyclable supports for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, p. 42–52, 2017.