

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

RAFAELA DE ANDRADE

SÍNTESE DE NOVOS MATERIAIS MAGNÉTICOS E POROSOS À BASE
DE SÍLICA E MAGNETITA NATURAL PARA APLICAÇÃO COMO
SUPORTES PARA A ENZIMA LIPASE

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

RAFAELA DE ANDRADE

SÍNTESE DE NOVOS MATERIAIS MAGNÉTICOS E POROSOS À BASE
DE SÍLICA E MAGNETITA NATURAL PARA APLICAÇÃO COMO
SUPORTES PARA A ENZIMA LIPASE

Trabalho de conclusão de curso apresentado
junto à atividade de ensino “Trabalho de
conclusão de curso - QUI” do curso de
Química, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Valmir Benvenuti

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Roberta Bussamara

Porto Alegre

2019

*Dedico este trabalho em memória a minha bisavó
Diva Carvalho, por ter me ensinado a enfrentar as
batalhas da vida sem esquecer o bom humor.*

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer sinceramente e de todo o coração às pessoas que foram essenciais para a minha trajetória acadêmica e para a realização deste trabalho.

Primeiramente, ao meu orientador, *Edilson Benvenuti*, por todo o conhecimento compartilhado ao longo desses anos de orientação na iniciação científica, por ser meu exemplo de profissional ético, por sempre me incentivar e por demonstrar uma paixão pela química ímpar e cativante.

À minha co-orientadora, *Roberta Bussamara*, por toda a paciência e carinho, pelas discussões e conhecimentos divididos que foram fundamentais para a realização deste trabalho e por todas as vezes que “botou a mão na massa” comigo no laboratório.

Às demais professoras do Laboratório de Sólidos e Superfícies da UFRGS: *Tania Maria Haas Costa*, *Leliz Ticona Arenas* e *Eliana Weber de Menezes* pela disponibilidade, acolhida e contribuições com os trabalhos desenvolvidos.

A todos os meus colegas de laboratório, pelos momentos de distração, de ajuda e de discussão. Em especial, à *Natália*, por ter sido minha companheira de laboratório, a realização deste trabalho não seria possível sem a tua parceria, muito obrigada. Aos meus amigos: *Billy*, *Danielle* e *Carol*, pela amizade que começou no laboratório e se estendeu para a vida. À minha “chefe”, amiga e “puxadora de orelhas”, *Monique*, não tenho nem palavras para descrever o quanto a convivência contigo me acrescentou, acadêmica e pessoalmente, obrigada por tudo.

Às minhas amigas: *Jana*, *Gabi*, *Adri* e *Mi*, por acreditarem mais em mim que eu mesma, pelo incentivo ao longo de praticamente toda a graduação e por me ensinarem o valor da amizade e do diálogo.

Aos meus companheiros budistas do *bloco Canal 10*, minha segunda família, por todo incentivo e por me ensinarem a ser uma pessoa mais benevolente e preocupada com os outros. Em especial, a minha vó, *Dilse*, gratidão eterna por me apresentar esta filosofia de vida maravilhosa e que tornou a minha trajetória acadêmica mais significativa e otimista.

Aos meus filhotes de quatro patas, *Jaime* e *Stitch*, pela companhia (nem sempre silenciosa) nos dias e noites de estudo. Eles não precisam falar para fazer eu me sentir amada nos dias que eu mais preciso.

Por último, mas não menos importante, à *toda a minha família*, por todo apoio, amor e compreensão. Em especial, aos meus pais, *Karini* e *Cristo*, por todo o incentivo ao estudo desde pequena. Sempre que eu digo “eu gosto de estudar” e recebo olhares desconfiados da maioria das pessoas eu me remeto ao carinho e paciência de vocês com as minhas tarefas escolares, isso foi essencial para eu criar a motivação a busca pelo conhecimento que hoje faz parte de quem

eu sou. Obrigada por me ensinarem que o que realmente importa não se compra com dinheiro.
Obrigada por sempre confiarem em mim e em minhas escolhas.

RESUMO

Existem diversas vantagens na utilização de enzimas como biocatalisadores, como grande eficiência catalítica e atuação em condições brandas de reação. Nesse contexto, a enzima lipase, que age sob as ligações de ésteres carboxílicos, encontra aplicações na produção de biodiesel, indústria de detergentes, degradação de polímeros entre outros. Entretanto, seu uso se torna limitado devido ao seu alto custo e dificuldade de reutilização. Para superar essa problemática, a imobilização de enzimas em suportes sólidos tem sido um tópico de grande valor na pesquisa científica. Neste trabalho, foram propostos novos suportes magnéticos para a imobilização da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Materiais magnéticos e porosos foram obtidos pelo método sol-gel com diferentes proporções entre sílica e magnetita (MNX1 e MNX2) e foram, posteriormente, modificados com nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana (MNX1AuNp e MNX2AuNp). Os materiais foram caracterizados através de difratogramas de raios X, medidas de magnetização, isothermas de adsorção e dessorção de N₂ e análise termogravimétrica, enquanto a dispersão de AuNp estabilizada por quitosana foi caracterizada através de espectroscopia no UV-Vis. Os resultados indicam que os materiais são mesoporos, magnéticos (devido a presença de magnetita) e que a imobilização acontece dentro dos poros. A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método de cultivo em caldo, o qual demonstrou que os materiais não possuem atividade antimicrobiana. A atividade enzimática foi avaliada para os quatro materiais através do método colorimétrico envolvendo a hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato sendo que o material MNX2AuNp apresentou a maior atividade. Otimizou-se os parâmetros de imobilização através de um planejamento fatorial 2² obtendo-se tempo de imobilização de 15 h e pH igual a 5. Nessas condições, imobilizou-se cerca de 97% da enzima oferecida, obtendo-se 8 U g⁻¹ de atividade da enzima suportada no material MNX2AuNp. Tanto o material MNX2 quanto o material MNX2AuNp podem ser reutilizados mantendo cerca de 30 e 45% da atividade inicial após 12 ciclos, além disso, o material MNX2AuNp pode ser estocado por cerca de quatro meses sem perda de atividade da enzima imobilizada. Assim, os materiais magnéticos com estrutura de poros planejada desenvolvidos neste trabalho possuem potencial aplicação como suportes para lipase, sendo reutilizáveis e de fácil recuperação do meio reacional.

Palavras-chave: magnetita natural, lipase, nanopartículas de ouro, quitosana, biocatalisador recuperável.

ABSTRACT

There are many advantages in the enzyme's use as biocatalyst, such as large catalytic efficiency and action in reactions under mild conditions. In this sense, the lipase, which acts on carboxylic ester bonds, find applications in biodiesel production, detergents industry, polymers' degradation among others. However, both high cost and difficult recovery limit the enzyme use. However, once these obstacles are overcome, the enzyme's immobilization on solid supports turns out to be a high-value topic of scientific research. In this work, new magnetic supports for the immobilization of the enzyme lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) were proposed. Porous and magnetic materials were obtained by the sol-gel method of synthesis with two different silica/magnetite ratios (MNX1 and MNX2) and, subsequently, they were modified with gold nanoparticles stabilized by chitosan (MNX1AuNp and MNX2AuNp). The materials were characterized by X-ray diffraction, N₂ adsorption-desorption isotherms, thermogravimetric analysis and magnetic properties measurements. The AuNp dispersion was characterized by UV-Vis spectroscopy. The results indicate that the materials are mesoporous, magnetic (due to the presence of magnetite) and that the enzyme is immobilized inside the pores. Antimicrobial activity was evaluated by the broth culture method, which showed that the materials do not have antimicrobial activity. The enzymatic activity was evaluated for the four materials through colorimetric method involving the *p*-nitrophenillpalmitate hydrolysis. The support MNX2AuNp presented the best activity value, so, the immobilization parameters were optimized for this material through a two-level factorial design which led to a the immobilization time of 15 h and pH of 5. In these conditions, about 97% of immobilization efficiency is obtained, which corresponds to 8 U g⁻¹ of activity presented by the supported enzymes on the MNX2AuNp material. Both MNX2 and MNX2AuNp can be reutilized. After 12 cycles, the supports preserved 30 and 45% of the initial activity, respectively. Moreover, the material MNX2AuNp can be stocked for four months without activity loss. Therefore, the magnetic materials with a planned porous structure developed in this work have potential application as easy-recoverable and recyclable lipases supports.

Keywords: natural magnetite, lipase, gold nanoparticles, chitosan, recoverable biocatalyst

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	OBJETIVOS.....	14
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Lipases: Aplicações e imobilização.....	15
3.1.1	Suportes magnéticos.....	19
3.2	Química verde e magnetita natural.....	21
3.3	Síntese de xerogéis magnéticos pelo método sol-gel de síntese.....	23
3.4	Nanopartículas de ouro (AuNp).....	24
3.5	Otimização de parâmetros e planejamento fatorial.....	25
4.	METODOLOGIA.....	27
4.1.	Preparação do xerogel pelo método sol-gel.....	27
4.2.	Preparação da dispersão de nanopartículas de ouro (AuNp).....	27
4.3.	Incorporação de AuNp nos materiais.....	28
4.4.	Imobilização da enzima lipase nos materiais.....	28
4.5.	Medidas de atividade antimicrobiana.....	28
4.6.	Medidas de atividade enzimática da enzima lipase.....	29
5.	EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO.....	32
5.1.	Difração de raios X.....	32
5.2.	Espectroscopia na região do UV-Visível.....	32
5.3.	Análise Termogravimétrica.....	32
5.4.	Isotermas de Adsorção e Dessorção de N ₂	32
5.5.	Medidas de magnetismo.....	33
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.1	Caracterização dos materiais.....	34
6.1.1	Nanopartículas de ouro.....	34
6.1.2	Difratogramas de raios X.....	35
6.1.3	Magnetização.....	36
6.1.4	Análise termogravimétrica.....	37
6.1.5	Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio.....	39
6.2	Medidas de atividade antimicrobiana.....	41
6.3	Medidas de atividade enzimática.....	42

6.3.1	Escolha dos materiais	42
6.3.2	Otimização dos parâmetros de imobilização no material MNX2AuNp e comparação entre MNX2 e MNX2AuNp	43
6.3.3	Ensaio de reciclo de lipase imobilizada em MNX2 e MNX2AuNp	45
7.	CONCLUSÃO	48
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXO – A	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema geral da reação da lipase. Adaptado de MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, (2019).	15
Figura 2: Estrutura na forma aberta e fechada da enzima TLL. Adaptado de FERNANDEZ-LAFUENTE, (2010).	16
Figura 3: Esquemas de reações utilizando a enzima TLL. (a) Alcoólise. (b) Acidólise. (c) Interesterificação. (d) Separação enantiosseletiva. Adaptado de FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010	19
Figura 4: Esquema de imobilização de enzimas por adsorção em suporte com estrutura de poros adequada.	19
Figura 5: Suporte magnético em meio aquoso antes e após aplicação de campo magnético externo.	21
Figura 6: Estrutura da quitosana. Adaptado de RAMÍREZ (2010).	25
Figura 7: Representação geométrica de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Adaptado de TEÓFILO, FERREIRA, 2005.	26
Figura 8: (a) Magnetita natural. (b) Magnetita após ser pulverizada.	27
Figura 9: Reação de hidrólise de p-nitrofenilpalmitato catalisada por lipase.	29
Figura 10: Espectro na região do UV-Vis das dispersões (fator de diluição: 10 \times), sobrenadante e lavagens após imobilização em (a) MNX1 e (b) MNX2.	34
Figura 11: Difratoograma de Raios X da magnetita natural utilizada (MN) e dos materiais sintetizados. As barras em preto localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores de 2θ para a magnetita (JCPDS N $^{\circ}$ 19-0629).	35
Figura 12: Curvas de magnetização obtidas para a magnetita natural (MN) e materiais sintetizados.	36
Figura 13: Termogramas obtidos para os xerogéis com e sem AuNp e para o material MNX2AuNp após imobilização da enzima TLL.	38
Figura 14: (a) Isotermas de adsorção e dessorção de N $_2$ dos materiais e (b) distribuição de tamanho de poros das amostras MNX2AuNp e MNx2AuNp TLL.	40
Figura 15: Isotermas de adsorção e dessorção de N $_2$ dos materiais (a) MNX1 e MNX1AuNp. (c) MNX2 e MNX2AuNp. Distribuição de tamanho de poros das amostras (b) MNX1 e MNX1AuNp e (d) MNX2 e MNX2AuNp.	40
Figura 16: Resultados de reciclo da enzima TLL suportada nos materiais MNX2 e MNX2AuNp. As barras indicam o desvio padrão das triplicatas.	46
Figura 17: Tabelas originais utilizadas para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aplicações da enzima TLL.....	17
Tabela 2: Exemplos de materiais magnéticos aplicados à imobilização de lipases.	20
Tabela 3: Exemplos de métodos de síntese da magnetita e suas desvantagens frente aos princípios de Química Verde. Adaptado de UNSOY et al.,2015 e SHENG-NAN et al.,2014	22
Tabela 4: Tamanhos médios de cristalito obtidos a partir da equação de <i>Scherrer</i>	36
Tabela 5: Parâmetros magnéticos obtidos para os materiais estudados, onde M_S é a magnetização de saturação, H_C é o campo coercitivo, M_R é a remanência de magnetização. .	37
Tabela 6: Resultados da análise termogravimétrica dos materiais (perdas de massa em %).	39
Tabela 7: Dados da análise textural dos xerogéis.	41
Tabela 8: Resultados dos testes de atividade antimicrobiana.	42
Tabela 9: Resultados dos ensaios de atividade enzimática para a enzima TLL.	42
Tabela 10: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial.....	43
Tabela 11: Matriz planejamento e resultado obtido para os experimentos realizados.	43
Tabela 12: Resultados de porcentagem de imobilização, atividade enzimática e eficiência para o xerogel MNX2 e MNX2AuNp em tempos de imobilização diferentes.	45
Tabela 13: Tabela comparativa entre o suporte desenvolvido neste trabalho e materiais descritos na literatura.....	47

1. INTRODUÇÃO

Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas que fazem parte da família das hidrolases, catalisando a hidrólise de triacilgliceróis em gliceróis e ácidos graxos. Elas são consideradas biocatalisadores versáteis, pois possuem propriedades régio-seletivas e enantio-seletivas. Por conta de suas propriedades, encontram aplicações em diversas áreas como na produção de fármacos, cosméticos, alimentos e biodiesel. Entretanto, o uso de lipases como biocatalisadores ainda enfrenta desafios tais como, alto custo e dificuldade de recuperação do meio reacional, o que impedem seu reuso.

Como alternativa, a comunidade científica tem se dedicado ao estudo da imobilização de lipases em suportes sólidos, como forma de permitir uma maior estabilidade da enzima, bem como a recuperação e reuso desse biocatalisador. Nesse cenário, suportes magnéticos destacam-se pelo aumento na praticidade de separação da enzima do meio reacional, apenas utilizando um campo magnético externo, ou seja, um ímã para recuperar a enzima. O uso de magnetita (Fe_3O_4) sintética no *design* de suportes magnéticos tem sido amplamente aplicado, no entanto, os processos de síntese são dispendiosos e geram resíduos, o que não se enquadra aos princípios da química verde.

A magnetita é um mineral abundante além de ser o composto mais magnético que ocorre naturalmente no planeta Terra. Portanto, é pertinente avaliar o potencial do uso da magnetita natural como suporte para enzimas, diminuindo as expensas, tanto financeiras como ambientais, da síntese da magnetita. Um suporte adequado deve possuir área superficial adequada para acomodar a lipase em sua superfície e possuir compostos ou grupos que interajam com a enzima. Magnetita pura não possui área superficial apreciável, não obstante pode-se aplicar o método sol-gel na presença de partículas magnéticas, permitindo a obtenção de materiais magnéticos com porosidade e área superficial apropriados.

Nanopartículas podem interagir com enzimas por adsorção aumentando a capacidade do suporte para a imobilização da enzima. A interação entre a lipase e nanopartículas ocorre através de interações físicas, ademais, nanopartículas podem ser facilmente incorporadas na superfície de matérias à base de sílica. Nanopartículas de ouro possuem atividade antimicrobiana e podem ser estabilizadas por quitosana, um polímero bioativo, que também é utilizado como suporte na imobilização de enzimas. Além disso, a quitosana é obtida através da desacetilação da quitina que é encontrada naturalmente em fungos e exoesqueleto de crustáceos, assim sendo, sua utilização também corrobora com os objetivos da química verde, como a utilização de matérias primas de fontes renováveis.

Diante do exposto, neste trabalho dois materiais magnéticos foram obtidos a partir da aplicação do método sol-gel na presença de Fe_3O_4 natural pulverizada. Em sequência, enxertou-se nanopartículas de ouro na superfície obtendo-se quatro suportes (MNX1, MNX2, MNX1AuNp e MNX2AuNp) que foram utilizados para a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Os materiais foram caracterizados por difração de raios X, medidas de magnetização, isotermas de adsorção e dessorção de N_2 e análise termogravimétrica. Os materiais tiveram suas atividades antimicrobianas testadas utilizando o método de diluição em caldo com a bactéria *Escherichia coli*. A atividade enzimática da lipase imobilizada nos suportes foi avaliada através da reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato. Parâmetros de imobilização (tempo e pH) foram otimizados utilizando o método multivariado de planejamento fatorial. Ensaios de reuso foram realizados utilizando repetidos ciclos de hidrólises.

2. OBJETIVOS

Este trabalho de conclusão de curso tem por objetivo desenvolver novos suportes porosos e magnéticos à base de sílica e magnetita natural que possam ser aplicados na imobilização da enzima lipase, visando a confecção de biocatalisadores estáveis e ativos.

Objetivos Específicos

- Obter xerogéis magnéticos de sílica pelo método sol-gel utilizando magnetita natural.
- Sintetizar nanopartículas de ouro (AuNp) estabilizadas por quitosana.
- Incorporar AuNp aos materiais.
- Caracterizar os materiais através de difratograma de Raios-X, medidas de magnetização, análise termogravimétrica e isothermas de adsorção e dessorção de nitrogênio.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos materiais frente a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*, utilizando o método de cultivo em caldo.
- Imobilizar a enzima lipase TLL nos suportes.
- Medir a atividade enzimática da lipase imobilizada, utilizando a reação de hidrólise do *p*-nitrofenilpalmitato.
- Otimizar parâmetros de imobilização: tempo e pH através de planejamento fatorial 2².
- Avaliar a capacidade de reuso das enzimas suportadas, realizando sucessivos ciclos de reação.
- Avaliar a estabilidade de estocagem em temperatura baixa das enzimas suportadas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Lipases: Aplicações e imobilização

Lipases são enzimas que fazem parte da família de hidrolases, por catalisarem reações de hidrólise. Elas são classificadas como E.C 3.1.1.3, ou seja, são hidrolases de triacilgliceróis. Possuem origem natural, sendo produzida por plantas oleaginosas, animais (lipase pancreática e pré-gástrica), bactérias (*Pseudomonas* e *Burkholderia*, por exemplo) e fungos como *Thermomyces lanuginous*, *Candida rugosa*, *Aspergillus* e *Rhizopus*. Elas são consideradas biocatalisadores versáteis, pois possuem propriedades régio-seletivas e enantio-seletivas. Devido a isso, elas encontram aplicações em diversas áreas como na produção de fármacos, cosméticos, alimentos e biodiesel (MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, 2019). Na figura 1, encontra-se o esquema geral da reação catalisada pela enzima lipase.

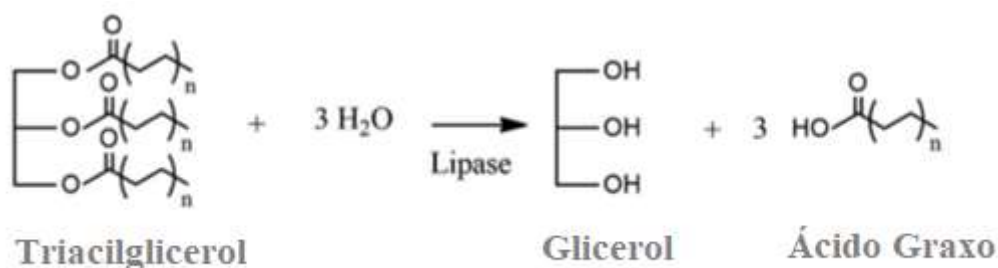


Figura 1: Esquema geral da reação da lipase. Adaptado de MELANI, TAMBOURGI, SILVEIRA, (2019).

Dentre os diversos tipos de lipase, a lipase proveniente do fungo *Thermomyces lanuginous* (TLL), possui a vantagem de ser mais estável que outras lipases e, por isso, encontra aplicações em diferentes ramos industriais e tecnológicos (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Estruturalmente, essa lipase possui cadeia única com 269 aminoácidos, pesa 31.700 g mol⁻¹ (JHA *et al.*, 1999) e forma quase esférica (35 Å x 45 Å x 50 Å). Assim como todas as lipases, ela possui uma tampa bastante móvel que cobre o sítio ativo, chamada de *lid*. Na presença de interfaces hidrofóbicas a *lid* se abre, permitindo a interação do sítio ativo (composto pela tríade clássica de aminoácidos Serina-Histidina-Aspartato) com o meio reacional (DEREWENDA *et al.*, 1994) (Figura 2). Esta enzima possui atividade em diversos tipos de solventes, como: solventes orgânicos, líquidos iônicos (RANTWIK, SHELDON, 2007), microemulsões de líquidos iônicos e água (um meio micro-heterogêneo) (PAVLIDIS, *et al.*, 2009) e fluidos supercríticos (KAMAT, BECKMAN, RUSSELL, 1995). Por conta da ampla versatilidade de

solventes e substratos, a TLL pode ser usada para diversas aplicações que se encontram sumarizadas na tabela 1.



Figura 2: Estrutura na forma aberta e fechada da enzima TLL. Adaptado de FERNANDEZ-LAFUENTE, (2010).

A maioria das enzimas precisam ser previamente imobilizadas para serem usadas como biocatalisadores industriais, a fim de que se obtenha um catalisador que possa ser reutilizado. Devido a isso, a imobilização das lipases tem sido intensamente estudada.

Entre as estratégias de imobilização, encontram-se a imobilização por múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte, o que aumenta a rigidez da estrutura da enzima, tornando-a mais estável. (MATEO *et al.*, 2007). No entanto, no caso da TLL, múltiplas ligações são difíceis de serem atingidas porque as ligações envolvem principalmente grupos amino secundários e a TLL possui apenas sete grupos Lisina (DEREWENDA *et al.*, 1994). Para superar este problema a aaminação da enzima é utilizada (RODRIGUES *et al.*, 2009), entretanto adiciona-se uma etapa a mais ao processo e perde-se em valores de atividade. Além disso, a adsorção física também é amplamente utilizada, necessitando de suportes com área superficial e estrutura de poros apreciáveis, conforme esquema apresentado na figura 4. Também é possível utilizar agentes de *cross-linking* como glutaraldeído, que consiste em utilizar um agente bifuncional para fazer as ligações desejadas, seu principal objetivo é formar um complexo de enzimas livre de suportes (FACIN *et al.*, 2019). Outra estratégia utilizada chama-se ativação interfacial (interação hidrofóbica), que se baseia na propriedade das lipases de interagir com suportes hidrofóbicos, abrindo a sua *lid*, estabilizando sua conformação aberta (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1998).

Tabela 1: Aplicações da enzima TLL

Aplicação	Descrição	Referências
Hidrólise de óleos e gorduras	Hidrólise de diferentes óleos para produzir ácidos graxos livres. Enzima específica para as posições 1 e 3 quando hidrólise é incompleta.	FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010
Alcoólise ou transesterificação de óleos de gorduras	Transesterificação de óleos, a fim de se obter triglicerídeos com estrutura planejada. (Figura 3 a). Como exemplo, saturar ácidos graxos a fim de aumentar a estabilidade oxidativa e produzir Biodiesel, cuja reação quando catalisada por lipase possui a vantagem de ter uma purificação simplificada (não há produtos de reações indesejáveis)	FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010 VASUDEVAN, BRIGGS, 2008;
Acidólise e Interesterificação de óleos	É o uso da TLL mais estudado. Acidólise utiliza ácidos graxos livres (Figura 3 b) e interesterificação utiliza um éster de ácido graxo (Figura 3 c). O óleo de soja é o óleo mais utilizado utilizando esta estratégia.	FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; TURAN, KARABULUT, VURAL, 2006
Modificação de óleos e gorduras	Produção de alimentos mais saudáveis: equivalentes a manteiga de cacau, gordura do leite humano, margarinas livres de gorduras trans e etc. Isso é possível devido a sua régio-seletividade que nenhum método químico de produção possui.	VILLENEUVE <i>et al.</i> , 2007; HOUDE, KADEMI, LEBLANC, 2004; LIU, CHANG, LIU, 2007
Resolução de misturas racêmicas	Explorando a enantiosseletividade da enzima, misturas racêmicas de ácidos e álcoois são separadas. (Figura 3 d). Por exemplo, TLL foi já utilizada na hidrólise enantiosseletiva do precursor de um agente anti-hipertensivo.	FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; SCHNELL <i>et al.</i> , 2000

Aplicações ambientais	TLL é utilizada na degradação de diversos polímeros que são prejudiciais para o meio ambiente (Exemplo: hidrólise da cadeia lateral do acetato de polivinila – PVAc). Tratamento de resíduo aquoso da indústria de carnes que geralmente contém óleos e gorduras difíceis de degradarem.	FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; CHATTOPADHYAY, SIVALINGAM, MADRAS, 2003
Pré-tratamento da lã	O pré-tratamento de tecidos de lã feito com TLL aumenta o tingimento do tecido com corantes reativos em condições mais brandas de temperatura.	KANTOUCH, RASLAN, EL-SAYED, 2005
Aplicações em limpeza	O efeito da incorporação de TLL em detergentes gera uma melhor capacidade de limpeza, pois há a hidrólise enzimática do óleo disperso. A indústria de detergentes é responsável por aproximadamente 34% da movimentação financeira do mercado de enzimas mundial.	JURADO et al., 2006; SANCHEZ, DEMAINE, 2011

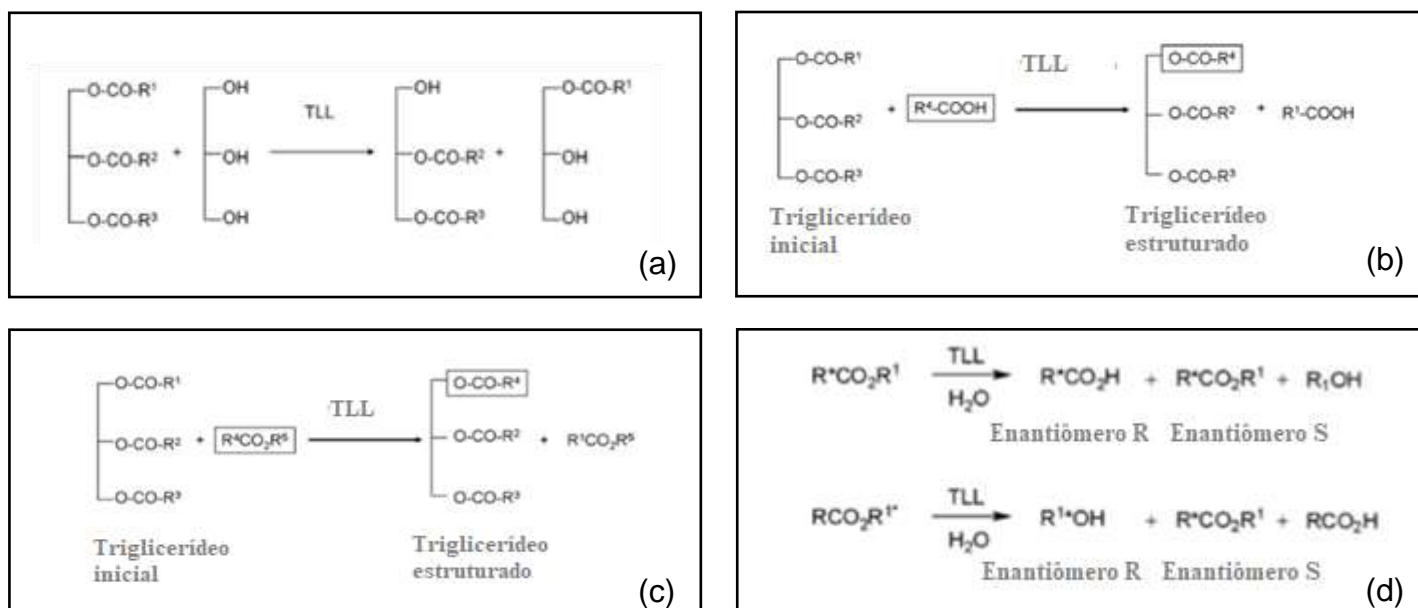


Figura 3: Esquemas de reações utilizando a enzima TLL. (a) Alcoolise. (b) Acidólise. (c) Interesterificação. (d) Separação enantiosseletiva. Adaptado de FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010

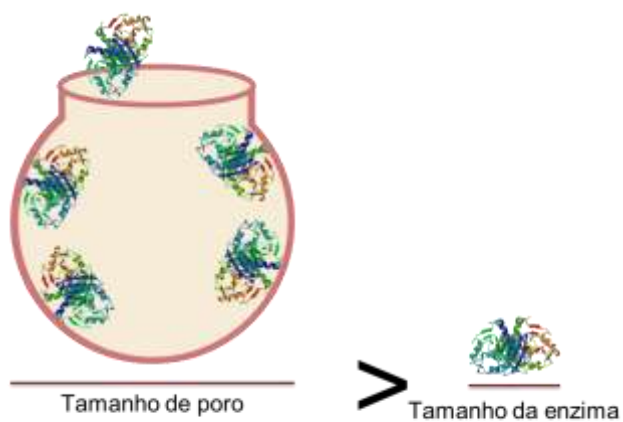


Figura 4: Esquema de imobilização de enzimas por adsorção em suporte com estrutura de poros adequada.

3.1.1 Suportes magnéticos

O design de suportes com resposta magnética para a imobilização de enzimas é extremamente vantajoso pois permite a separação do biocatalisador do meio reacional

utilizando um campo magnético externo, ou seja, um ímã como mostra a figura 5. Neste contexto, partículas e nanopartículas magnéticas sintéticas têm sido amplamente utilizadas, principalmente compostas de um óxido de ferro misto contendo Fe^{3+} e Fe^{2+} chamado de magnetita (Fe_3O_4). Com a utilização de suportes magnéticos, evita-se a necessidade de centrifugação e filtração, otimizando o processo de separação. Na tabela 2, é possível encontrar um resumo de materiais magnéticos aplicados a imobilização de lipases, juntamente com a estratégia de imobilização e dados sobre sua atividade.

Tabela 2: Exemplos de materiais magnéticos aplicados à imobilização de lipases.

Técnica de imobilização	Suporte	Tipo de lipase	Porcentagem de imobilização (%)	Eficiência (%)	Ref.
Adsorção (ativação interfacial)	Nanopartícula Core-shell $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_2$ hidrofóbica	<i>Burkholderi a sp.</i>	97	92	TRAN, CHEN, CHANG, 2012
Ligação covalente	Fe_3O_4 nanoflowers/metacrilato glicidílico	<i>Candida rugosa</i>	-	65	ALI et al., 2015
<i>Cross-linked</i>	Fe_3O_4 /quitosana	<i>Candida rugosa</i>	-	55.6	WU et al., 2009
Ligação covalente	Fe_3O_4 com aminossilano	<i>Candida rugosa</i>	-	58.2	CUI et al., 2010
<i>Cross-linked</i>	Nanocompósito core-shell Fe_3O_4 -MCM-41	<i>Candida rugosa</i>	76	-	XIE, ZANG, 2016

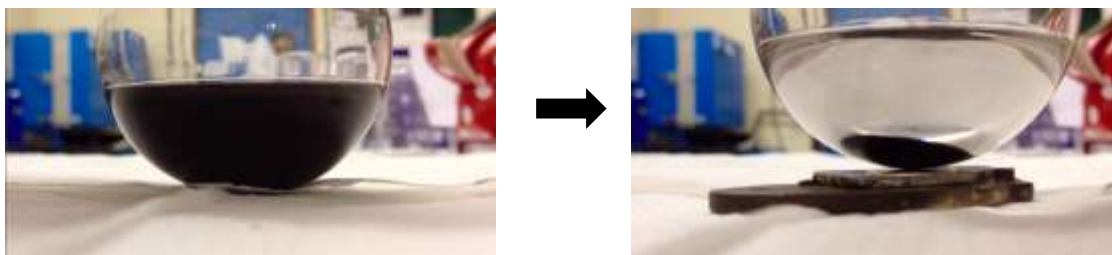


Figura 5: Suporte magnético em meio aquoso antes e após aplicação de campo magnético externo.

3.2 Química verde e magnetita natural

O conceito mais aceito de química verde foi publicado em 1998 por Paul Anastas e John Warner e consiste no design de processos químicos e produtos que reduzem ou eliminam o uso e geração de substâncias perigosas e prejudiciais. De acordo com Anastas, Warner (1998) “Nós estamos todos no mesmo barco e nós só temos um barco”.

A ideia básica da química verde é proteger o meio ambiente da poluição. Para isso, doze princípios da química verde demonstram o que seriam atitudes para proteger o ambiente. (VERMA,2015; LENARDÃO *et al.*, 2003).

1. Prevenção – evitar a produção de resíduos.
2. Economia atômica – maximizar a incorporação dos materiais de partida no produto final.
3. Síntese de produtos menos perigosos – gerar substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade para o ambiente e para os seres humanos.
4. Desenho de produtos seguros – produtos químicos devem ser desenhados para serem o menos tóxicos possíveis.
5. Solventes e auxiliares mais seguros – auxiliares devem se tornar desnecessários ou inofensivos, quando utilizados.
6. Busca pela eficiência de Energia – quando possível, processos químicos devem ser conduzidos a temperatura e pressões ambientes.
7. Uso de fontes renováveis de matéria prima – quando possível, a utilização de matérias-primas renováveis deve ser escolhida.
8. Evitar a formação de derivados – a derivatização deve ser minimizada ou evitada, pois acrescentam etapas que podem gerar resíduos aos processos.
9. Catálise – reagentes catalíticos devem ser escolhidos em detrimento dos reagentes estequiométricos.

10. Desenho para a degradação – ao final da sua função, os produtos devem se degradar de forma completa e não prejudicial.
11. Análise em tempo real para a prevenção da poluição – desenvolvimento de metodologias para o controle do processo antes da formação de substâncias nocivas.
12. Química intrinsecamente segura para a prevenção de acidentes – substâncias e processos pensados para minimizar o potencial de vazamentos, explosões, incêndios e acidentes em geral.

Dentre os princípios da química verde, destaca-se a ênfase no uso de catalisadores e utilização de condições brandas de reação. Portanto, o desenvolvimento de biocatalisadores encaixam-se perfeitamente na prevenção aos danos causados ao meio ambiente pelas substâncias químicas.

Apesar da extensa pesquisa feita na busca por suportes para enzimas magnéticas, a magnetita utilizada é sintetizada por diversos métodos que, geralmente, não condizem com algum princípio da química verde, como sumarizado na tabela 3. Além disso, a magnetita sintética é suscetível a oxidação sob condições ambientes (quando exposta ao ar), diminuindo sua propriedade magnética (KETTELER *et al.*, 2001; KHAN *et al.*, 2015). Para evitar isso é necessária revestir, encapsular ou funcionalizar as partículas de Fe_3O_4 , adicionando mais uma etapa no processo de síntese de um suporte magnético adequado.

A magnetita é um mineral abundante, sendo o composto mais magnético encontrado no planeta Terra (CHANG, KIRSCHVINK, 1989). Ela pode ser encontrada em areias de praia, em solos encharcados e em depósitos minerais que se localizam no Brasil, Estados Unidos, Rússia, Canadá, China, Chile, Suíça, Austrália, México e Noruega. (KENNEDY, 1990; RIVAS *et al.*, 2006, 2009). De acordo com Salazar-Camacho e colaboradores (2013) a maioria dos estudos com magnetita são feitos com magnetita sintética pura e homogênea e poucos trabalhos reportam o uso de materiais naturais ricos em Fe_3O_4 .

Tabela 3: Exemplos de métodos de síntese da magnetita e suas desvantagens frente aos princípios de Química Verde. Adaptado de UNSOY *et al.*, 2015 e SHENG-NAN *et al.*, 2014

Método de síntese	Desvantagens
Solvotérmico	<ul style="list-style-type: none"> • Altas temperaturas (200 °C ou mais) • Altas pressões

	<ul style="list-style-type: none"> • Resíduos de solvente (quando não é utilizado água)
Co-precipitação	<ul style="list-style-type: none"> • Condições básicas • Uso de agente dispersante • Atmosfera inerte recomendada
Decomposição térmica	<ul style="list-style-type: none"> • Atmosfera inerte necessária • Uso de agente dispersante • Altas temperaturas (100 °C ou mais)
Sol-gel	<ul style="list-style-type: none"> • Altas pressões • Geralmente, necessita de precursores caros • Uso de agente dispersante, surfactantes, ultrassom e etc

A fim de pontuar as diferenças entre a magnetita sintética e natural, os pesquisadores realizaram um estudo comparativo das características de superfície de ambas, sendo a magnetita natural proveniente do México e dois tipos de magnetita sintética comercial. Suas principais conclusões foram que as partículas de magnetita natural não possuem morfologia definida, tem tamanho muito variável, são mais agregadas e possuem mais impurezas que a magnetita sintética. Devido a isso, não se pode utilizar a magnetita natural em aplicações que exijam alto grau de pureza (como aplicações em medicina e indústria alimentícia) e nem forma ou tamanho definidos, no entanto, para aplicações mais robustas, como a adsorção de metais pesados, o mineral pode ser utilizado. Os autores do estudo comparativo demonstraram que tanto magnetita natural quanto sintética possuem boa capacidade de adsorção de Arsênio, As (IV), em soluções aquosas. Contudo, encontram-se poucos relatos na literatura do uso de magnetita natural, mesmo para aplicações mais robustas.

3.3 Síntese de xerogéis magnéticos pelo método sol-gel de síntese

O processo sol-gel de síntese, conhecido há mais de um século, caracteriza-se pela transição do sistema *sol* (dispersão de partículas coloidais) para um sistema *gel* (conectividade

entre as unidades, formando uma rede tridimensional). A reação de gelificação ocorre a baixas temperaturas e sua cinética é lenta quando utiliza-se alcóxidos de silício como precursores, o que permite controlar as propriedades finais do produto (tamanho e forma de partículas, volume e tamanho de poros e etc). Catalisadores ácidos ou básicos podem ser utilizados. Após a secagem do gel sob condições ambientes, forma-se um xerogel. (ALFAYA, KUBOTA, 2002; BENVENUTTI *et al.*, 2009)

Para sintetizar suportes adequados para imobilização de enzimas via estratégia de adsorção, necessita-se de materiais com apreciável área superficial. A magnetita pura não possui área superficial nem estrutura de poros, no entanto materiais porosos e magnéticos podem ser obtidos aplicando-se o método sol-gel de síntese na presença de magnetita (DEON *et al.*, 2019).

O método sol gel de síntese geralmente fornece sílicas mesoporosas, ou seja, com diâmetro de poros entre 2 e 50 nm, quando se utiliza catalisadores e precursores específicos em porcentagens adequadas. Logo, o material obtido possui estrutura de poros compatível para imobilizar biomacromoléculas, como enzimas, e nanoestruturas, como nanopartículas.

3.4 Nanopartículas de ouro (AuNp)

As nanopartículas de ouro possuem propriedades diferenciadas quando comparadas ao ouro em sua forma *bulk*, como baixa toxicidade, elevada biocompatibilidade e atividade antimicrobiana pronunciada (RUDRAMURTHY *et al.*, 2016; DIZAJ *et al.*, 2014; FERNANDEZ-MOURE *et al.*, 2017).

A atividade antimicrobiana mais pronunciada das AuNps ocorre em bactérias gram-negativas (NIEMIROWICZ *et al.*, 2014), sendo o exemplo de bactéria mais comum a *Escherichia coli* (OSANGA *et al.*, 2015). As formas de ação para gerar a morte bacteriana consistem na geração de orifícios nas paredes celulares e ligação ao DNA bacteriano, inibindo o processo de transcrição. (DIZAJ *et al.*, 2014; FERNANDEZ-MOURE *et al.*, 2017).

Devido as dimensões das nanopartículas, elas tendem a coalescer através do processo de fusão a fim de diminuir sua energia livre (ΔG), para evitar isso, agentes estabilizantes são utilizados. Surfactantes e polímeros podem ser utilizados, pois estabilizam as nanopartículas através de impedimento estérico devido às suas cadeias longas. (SCHIMID, 2004; TRAN, NGUYEN, 2011).

Na busca por utilização de matérias primas renováveis, recentemente a comunidade científica tem prestado atenção nos biopolímeros, como a quitosana (Figura 6) que é obtida

através da desacetilação da quitina encontrada naturalmente em fungos e no exoesqueleto de crustáceos (KAUSAR, 2019). A quitosana é bioativa, possui grupos amino em sua estrutura, é conhecida como agente estabilizante de nanopartículas metálicas (KAUSAR, 2019; BUI, PARK, LEE, 2016; THOMAS et al., 2012; LEIVA et al., 2015) e também é aplicada no ramo de imobilização de enzimas (WU *et al.*, 2009).

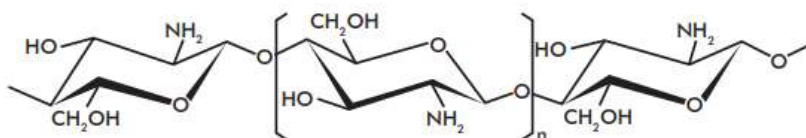


Figura 6: Estrutura da quitosana. Adaptado de RAMÍREZ (2010).

Nanopartículas de ouro possuem uma alta afinidade por biomoléculas, devido às interações eletrostáticas (FILLON et al., 2007). Em 2008, WU e colaboradores reportaram um estudo cinético comparativo entre a enzima lipase ancorada em nanopartículas de ouro e a enzima livre. Neste estudo foi demonstrado que utilizando o modelo cinético de Michaelis-Menten obtém-se o mesmo valor de velocidade máxima (V_{max}) para a enzima livre a enzima ancorada em AuNp, no entanto obtém-se uma constante de Michaelis (K_m) menor na presença das nanopartículas. Um valor menor de K_m representa uma maior afinidade da enzima e do substrato, portanto, a imobilização da lipase em AuNp aumenta a associação entre enzima e substrato por ser capaz de estabilizar o estado de transição enzima-substrato. Em conclusão, nanopartículas de ouro podem agir como um fator para aumentar a atividade enzimática da lipase. (WU *et al.*, 2008).

3.5 Otimização de parâmetros e planejamento fatorial

A otimização de parâmetros experimentais é tida como uma das etapas mais críticas do trabalho científico. Na maioria dos casos, o processo de otimização é realizado de maneira univariada, ou seja, mantém-se todos parâmetros constantes e varia-se apenas uma condição experimental por vez. Este tipo de abordagem não leva em conta as interações (efeitos sinérgicos ou antagônicos) entre as variáveis, além de necessitar um número muito grande de experimentos. Nesse contexto, sistemas multivariados têm ganhado destaque, pois diminuem o número de experimentos a serem feitos (economizando tempo, reagentes, uso de equipamentos e etc) (PERALTA-ZAMORA, DE MORAIS, NAGATA, 2005)

Dentre os métodos multivariados, os planejamentos fatoriais permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis. Se o objetivo é avaliar x fatores, o planejamento fatorial consistirá de 2^x experimentos, os níveis dos fatores são nomeados com o sinal de + e - em uma matriz de planejamento. Para poder estimar erros sem realização de repetições de todos os experimentos, utiliza-se o planejamento fatorial com ponto central (Figura 7), onde utiliza-se o valor médio dos níveis de todas as variáveis no ponto central (nível zero). (TEÓFILO, FERREIRA, 2005). Esta metodologia só pode ser aplicada quando se utiliza variáveis quantitativas, já que para variáveis qualitativas não podemos calcular ponto central. Assume-se desde o início que o sistema estudado é regido por alguma função (geralmente polinomial) descrita pelas variáveis experimentais. Através do uso de softwares específicos ou tabelas, é possível saber quais variáveis ou interações de variáveis influenciam significativamente na resposta avaliada.

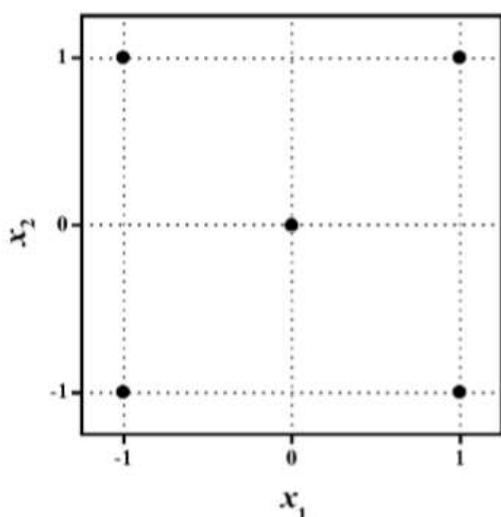


Figura 7: Representação geométrica de um planejamento fatorial 2^2 com ponto central. Adaptado de TEÓFILO, FERREIRA, 2005.

No que se refere à imobilização de enzimas, a otimização dos parâmetros experimentais de imobilização (como tempo, pH, temperatura e etc) é imprescindível para se obter a maior porcentagem de imobilização possível juntamente com a maior atividade das enzimas imobilizadas.

4. METODOLOGIA

4.1. Preparação do xerogel pelo método sol-gel

Magnetita (Fe_3O_4) de origem brasileira (Anitápolis, Santa Catarina) foi pulverizada em cadinho de porcelana até adquirir a forma de talco, conforme apresentado na figura 8 (b). A 1,5 gramas de magnetita pulverizada foram adicionados 7 mL de etanol p.a, sob agitação magnética, em seguida adicionou-se 3 mL de ortossilicato de tetraetila (TEOS) gota a gota. Após 30 minutos, acrescentou-se 2 mL de solução aquosa contendo 600 μL de catalisador (solução de HF/HCl 6 mol L^{-1}) para promover a reação de gelificação. A evaporação do solvente ocorreu em condições ambientes durante 7 dias e então, o material foi pulverizado e lavado com água/etanol e seco em linha de vácuo. Esse material foi denominado MNX1 (65% de Fe_3O_4 M/M). O mesmo procedimento utilizando-se 0,435 g de Fe_3O_4 , 3 mL de TEOS e 600 μL de catalisador foi realizado obtendo-se o material MNX2 (35% de Fe_3O_4 M/M).

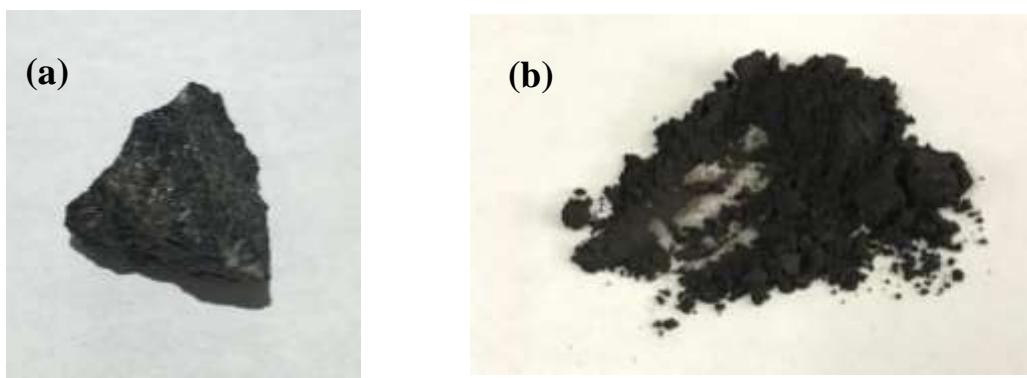


Figura 8: (a) Magnetita natural. (b) Magnetita após ser pulverizada.

4.2. Preparação da dispersão de nanopartículas de ouro (AuNp)

Quitosana (0,0750 g) foi pesada em balança analítica e transferida para um erlenmeyer. Foram adicionados 9 mL de água e 1 mL de ácido fórmico concentrado e a mistura permaneceu sob agitação magnética até a sua solubilização (aproximadamente 2 h). Após, 2 mL de Ácido Cloroáurico (HAuCl_4) na concentração de $1,5 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} foram adicionados e, então, 5 mL de uma solução (0,02 mol L^{-1}) recém preparada de boro hidreto de sódio (NaBH_4) foram adicionados sob agitação manual constante. A dispersão de nanopartículas de ouro foi

neutralizada com NaOH até pH próximo a 5,2 monitorado em pHgâmetro e caracterizada por espectroscopia no UV-Vis.

4.3. Incorporação de AuNp nos materiais

Para a imobilização das nanopartículas de ouro no material MNX1 e MNX2, 0,2 g dos materiais foram acondicionados em eppendorfs e adicionou-se 2 mL da dispersão de AuNp com coloração característica rosada e 2 mL de água deionizada, após total descoloração da dispersão em contato com o material MNX1, adicionou-se uma nova alíquota de 4 mL de dispersão diluída 2 vezes com água deionizada. A mesma descoloração rápida não foi observada no material MNX2. Após 48 h, ambas dispersões estavam descoloridas, então, os materiais foram lavados 3 vezes com água, sendo que os sobrenadantes e as lavagens foram reservados para posterior análise. Os materiais foram secos em linha de vácuo e denominados MNX1AuNp e MNX2AuNp.

4.4. Imobilização da enzima lipase nos materiais

Tampão tris (tris(hidroximetil)aminometano), 50 mmol L⁻¹ com pH variável dependendo do ensaio (de 5 a 9), foi utilizado para diluir a enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), a fim de adequar as medidas de absorvância à curva de calibração nos ensaios de atividade enzimática.

A imobilização das enzimas nos suportes ocorreu da seguinte maneira: 5 mg de material (exceto nos ensaios de reuso, no qual utilizou-se 10 mg de material e manteve-se a proporção de enzima oferecida de 60 µL a cada mg) foram dispostos em eppendorfs. Após, adicionou-se 300 µL das suspensões diluídas da lipase. Sob temperatura ambiente, os recipientes foram mantidos sob agitação mecânica moderada por tempos variáveis. Posteriormente, os materiais foram separados magneticamente (com um ímã) e lavados 3 vezes com tampão tris, 50 mmol L⁻¹ com pH dependente do ensaio realizado. Sobrenadantes e lavagens foram reservados para posterior análise de atividade enzimática.

4.5. Medidas de atividade antimicrobiana

Para os ensaios de atividade antimicrobiana, foi utilizado o método de cultivo em caldo. A bactéria gram-negativa *Escherichia coli* (linhagem comercial - ATCC® 11775™ (Sigma)) foi

cultivada num meio LB (Luria-Bertani) 20 g L⁻¹ previamente esterilizado à 1 bar e 120 °C por 20 min. Manteve-se a incubação durante 1 h a 37 °C, sob agitação orbital. Então, a bactéria cultivada foi mantida em contato com 3 mg dos materiais durante 24 h a 37 °C e agitação orbital. Após, separou-se o material utilizando-se um imã. A densidade bacteriana foi determinada pela medida da intensidade de turbidez em espectrofotômetro UV (600 nm) e comparada com controles positivos (meio de cultura e bactéria) e negativos (somente meio, sem bactéria). Os Testes antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Fungos de Importância Médica e Biotecnologia do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

4.6. Medidas de atividade enzimática da enzima lipase

As medidas de atividade enzimática tiveram como base a ação da enzima lipase na hidrólise de ácidos graxos. *p*-nitrofenilpalmitato foi o substrato utilizado, pois a liberação do produto da reação (*p*-nitrofenol) pode ser acompanhada através do aumento na absorbância lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 410 nm (PENCREAC'H e BARATTI, 1996). Um esquema da reação é apresentado na Figura 9.

As medidas de absorbâncias foram relacionadas com os valores de concentração de *p*-nitrofenol por meio de uma curva de calibração na faixa de 0 a 0,045 μmol mL⁻¹. Uma unidade de atividade enzimática (1 U) foi definida como a quantidade de enzima que converte 1 μmol de *p*-nitrofenilpalmitato em *p*-nitrofenol em 1 minuto de reação. Todas medidas foram realizadas em duplicata (com exceção dos ensaios de reuso, que foram realizados em triplicata).

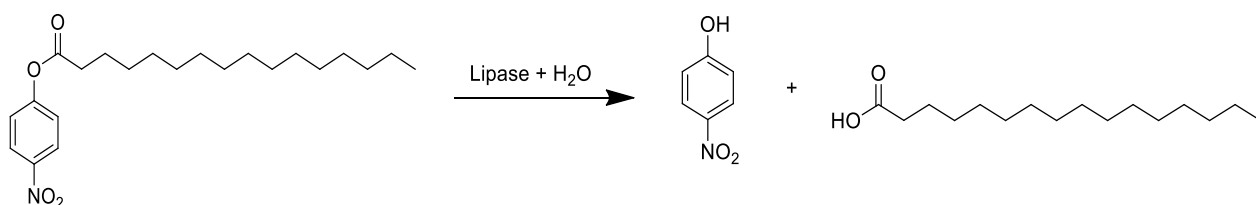


Figura 9: Reação de hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato catalisada por lipase.

O preparo da solução que contém o substrato oferecida aos materiais após imobilização ocorreu da seguinte forma: 90 mg de *p*-nitrofenilpalmitato foram dissolvidos em 30,0 mL de álcool isopropílico sob aquecimento a 40 °C. Essa solução foi gotejada lentamente numa solução de tampão tris (50 mmol L⁻¹ pH 7,5) com 40 mg de Triton X100 numa proporção de 1:9.

Com o objetivo de medir as atividades dos suportes, as massas dos suportes foram dispostas em eppendorfs, onde foram oferecidos 1800 μL de solução contendo o substrato da hidrólise estudada a cada 5 mg de material. O sistema foi homogeneizado levemente sob agitação mecânica em banho a 37°C. Após 5 minutos, o material foi separado com imã e realizou-se a leitura de absorbância do sobrenadante contendo o produto *p*-nitrofenol. Esse mesmo procedimento foi utilizado para 200 μL da dispersão de enzima livre, dos sobrenadantes e das lavagens. O volume final das medidas - 1,8 mL para os suportes e 2,0 mL para enzima livre, sobrenadantes e lavagens - foi levado em conta nos cálculos de atividade. As equações que foram utilizadas são descritas nas equações 1 e 2.

$$A_{enz}(U) = \frac{[PNP] \times v_{ensaio}}{t} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$A_{enz}(U/mL) = \frac{[PNP] \times v_{ensaio}}{t \times v_{enzima}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde: A_{enz} é a atividade enzimática em U ou U mL^{-1} (quando relativa ao volume de enzima oferecido no ensaio); $[PNP]$ corresponde a concentração de *p*-nitrofenol calculada a partir da curva de calibração (em $\mu\text{mol mL}^{-1}$); v_{ensaio} é o volume final do ensaio em mL; t corresponde ao tempo do ensaio (em minutos) e v_{enzima} é igual ao volume de enzima livre ou do sobrenadante adicionado no ensaio, ou volume de enzima oferecido ao suporte (em mL).

O rendimento de imobilização foi calculado segundo a Equação 3.

$$\text{Imobilização}(\%) = \frac{A_{livre} - (A_{sobrenadante} + A_{lavagens})}{A_{livre}} \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde: A_{livre} é a atividade da enzima livre que foi oferecida ao suporte, $A_{sobrenadante}$ corresponde a atividade da enzima que resta no sobrenadante após imobilização e $A_{lavagens}$ corresponde a atividade da enzima nas lavagens, todas relativas em U mL^{-1} .

Para calcular a eficiência, utilizou-se a Equação 4.

$$\text{Eficiência}(\%) = \frac{A_{imobilizada}}{A_{livre} \times \left(\frac{\text{Imobilização}}{100} \right)} \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde $A_{\text{imobilizada}}$ corresponde a atividade da enzima imobilizada nos suportes (em U); A_{livre} é a atividade enzimática da enzima livre (em U) e Imobilização corresponde a porcentagem de imobilização obtida pela Equação 3 (em %).

5. EQUIPAMENTOS E TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO

5.1. Difração de raios X

A análise foi feita com os materiais na forma pulverizada, utilizando-se um difratômetro *Rigaku* modelo *Ultima IV*. A fonte de raios X utilizada foi de $\text{CuK}\alpha$ médio ($\lambda=0,1542$ nm), e foi empregado um gerador de tensão e de corrente de 40 kV e 17 mA, respectivamente.

5.2. Espectroscopia na região do UV-Visível

O espectro da dispersão de nanopartículas de ouro foi obtido utilizando espectrofotômetro *Varian* modelo *CARY 50 Conc.* com janela espectral de 200 a 800 nm, e água destilada como referência.

As leituras de densidade óptica em 600 nm utilizados na medida de atividade antimicrobiana foram realizadas através de espectrofotômetro *BioRad Model550*.

As leituras de absorvância em 410 nm para a medida de atividade enzimáticas foram obtidas através do espectrofotômetro *Amersham Biosciences* modelo *Ultrospec 3100 Pro*.

5.3. Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas foram realizadas sob fluxo inerte de argônio utilizando o equipamento *Shimadzu Instrument* modelo *TGA-50*, com taxa de aquecimento de $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, partindo da temperatura ambiente até $895\text{ }^{\circ}\text{C}$.

5.4. Isotermas de Adsorção e Dessorção de N_2

As análises foram feitas na temperatura do nitrogênio líquido (-196°C) utilizando-se o equipamento *Tristar Krypton 3020 Micromeritics*. A área superficial específica dos materiais foi obtida empregando-se o método BET (Brunauer, Emmett e Teller), e as curvas de distribuição de tamanho de poros das amostras foram determinadas utilizando o método BJH (Barret, Joyner e Halenda).

5.5. Medidas de magnetismo

As propriedades magnéticas dos materiais foram estudadas utilizando o magnetômetro de amostra vibrante (VSM) *EZ9MicroSense*. Os dados foram adquiridos em função do campo aplicado ($M \times H$), em temperatura ambiente com varredura de campo entre -15 e $+15$ kOe.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Caracterização dos materiais

6.1.1 Nanopartículas de ouro

Uma maneira de caracterizar uma dispersão de nanopartículas de ouro é observar sua banda de absorção na região do UV-Vis. Essa banda ocorre devido a ressonância de plasmon de superfície, que é uma consequência da oscilação coerente dos elétrons de condução do ouro sob a influência do campo eletromagnético da luz.

A figura 10 mostra a caracterização das dispersões, sobrenadantes e lavagens através de espectroscopia no UV-Vis.

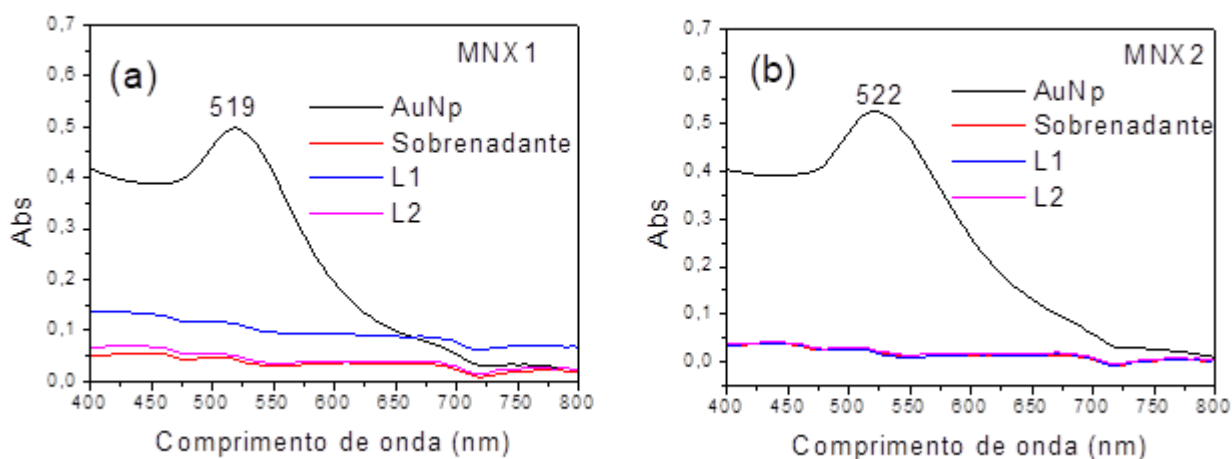


Figura 10: Espectro na região do UV-Vis das dispersões (fator de diluição: 10×), sobrenadante e lavagens após imobilização em (a) MNX1 e (b) MNX2.

A presença da banda em λ próximo a 520 nm, é típica para nanopartículas de ouro esférica e com diâmetro menor que 10 nm. (EUSTIS, EL-SAYED, 2006; PANIGRAHI *et al*, 2007).

Após o contato dos materiais com a dispersão, o sobrenadante e as lavagens também foram analisados por espectroscopia UV-Vis. O desaparecimento da banda de ressonância de plasmon das nanopartículas de ouro no sobrenadante e sua ausência nas lavagens indicam a adsorção efetiva das AuNp na superfície dos xerogéis.

6.1.2 Difratomogramas de raios X

Na figura 11 encontram-se os difratogramas de raios X da magnetita natural (MN), dos xerogéis magnéticos (MNX1 e MNX2) e dos xerogéis com adição de nanopartículas de ouro (MNX1AuNp e MNX2AuNp).

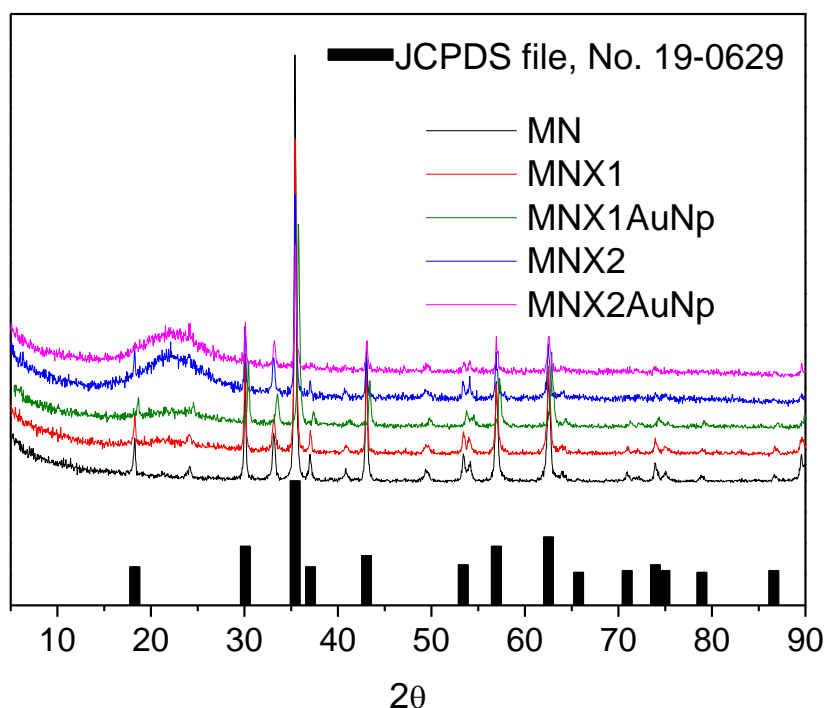


Figura 11: Difrátograma de Raios X da magnetita natural utilizada (MN) e dos materiais sintetizados. As barras em preto localizadas na parte inferior da figura apresentam os valores de 2θ para a magnetita (JCPDS N° 19-0629).

Conforme pode ser observado na figura 11, todas as amostras apresentaram os picos correspondentes às reflexões de Bragg referentes aos planos cristalinos da estrutura cúbica de face centrada da magnetita (JPDS file, N° 19-0629) indicando que as mesmas foram eficientemente incorporadas nos xerogéis de sílica.

Em 2θ próximo a 22° , observa-se o halo da sílica amorfa (CULLITY, 1956) que aparece no material com aproximadamente 65% de sílica em massa (MNX2 e MNX2AuNp). Nas amostras MNX1AuNp e MNX2AuNp observa-se que a adição de nanopartículas de ouro no material não altera o perfil da estrutura cristalina das partículas de magnetita contidas nos materiais. Através dos difratogramas, calcula-se as larguras a meia altura dos picos

correspondentes aos planos (311) e (440) e, utilizando a equação de *Scherrer* (LANGFORD, WILSON, 1978), é possível obter os tamanhos médios de cristalito para cada amostra. Esses resultados encontram-se na tabela 4. Os dados indicam que o tamanho médio de cristalito se mantém praticamente constante, o que indica que a modificação da magnetita não altera seu perfil cristalino.

Tabela 4: Tamanhos médios de cristalito obtidos a partir da equação de *Scherrer*.

Material	Tamanho médio de cristalito (± 1 nm)
MN	30,5
MNX1	30,5
MNX2	30,5
MNX1AuNp	32
MNX2AuNp	32,5

6.1.3 Magnetização

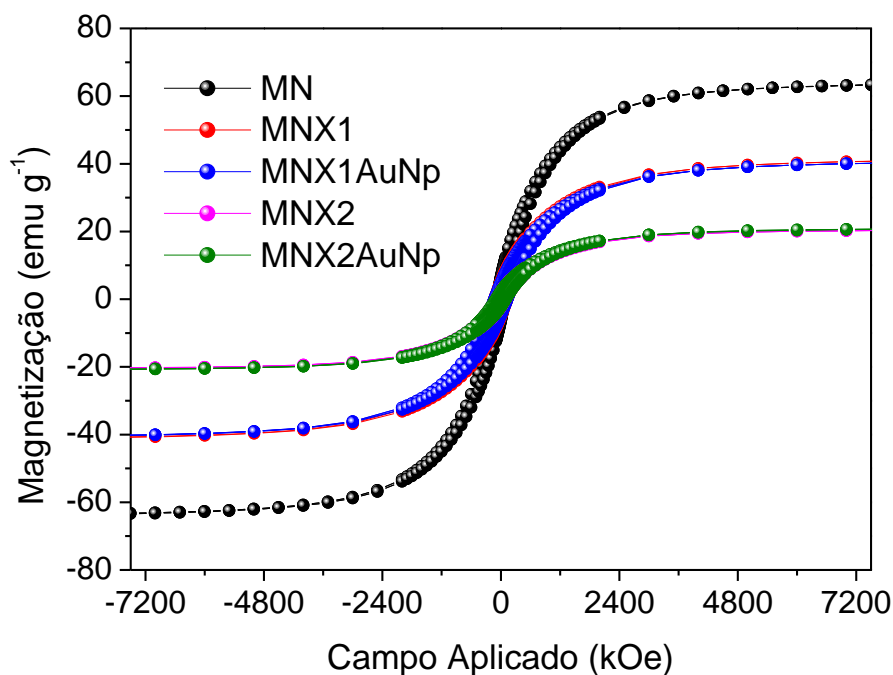


Figura 12: Curvas de magnetização obtidas para a magnetita natural (MN) e materiais sintetizados.

Para avaliar o comportamento magnético dos materiais, as histereses de magnetização foram obtidas e encontram-se na figura 12. Na tabela 5 encontram-se os dados de saturação de magnetização obtidos. O valor de saturação de magnetização (M_S) diminui entre a magnetita pura e os xerogéis magnéticos, comportamento que ocorre devido à redução na proporção de material magnético por grama de amostra. Também se observa que para o xerogel com maior proporção de sílica (MNX2) a diminuição na saturação de magnetização é mais pronunciada, pois neste material a proporção de magnetita é de aproximadamente 35% enquanto que no material MNX1 a proporção é de *ca.* 65%. As mudanças nos parâmetros magnéticos após a adição de nanopartículas de ouro não são significativas, demonstrando que a incorporação de AuNp nos materiais não influencia significativamente nas respostas magnéticas dos suportes. As modificações na magnetita não interferiram nas suas propriedades magnéticas, pois a proporção M_R/M_S permanece praticamente constante. Esses resultados vão ao encontro dos resultados de difração de raios X, onde observa-se que a estrutura cristalina do óxido de ferro é preservada.

Tabela 5: Parâmetros magnéticos obtidos para os materiais estudados, onde M_S é a magnetização de saturação, H_C é o campo coercitivo, M_R é a remanência de magnetização.

Material	$M_S (\pm 5 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1})$	$H_C (\pm 5 \text{ Oe})$	$M_R (\text{emu}\cdot\text{g}^{-1})$	M_R/M_S
MN	65	87	6,4	0,10
MNX1	42	132	5,3	0,13
MNX2	21	97	2,3	0,11
MNX1AuNp	41	131	4,8	0,12
MNX2AuNp	21	96	2,2	0,10

Embora os materiais MNX2 e MNX2AuNp possuam a menor saturação de magnetização, ela é suficiente para permitir a imediata separação do material quando exposto a um campo magnético externo (imã).

6.1.4 Análise termogravimétrica

Análises termogravimétricas dos materiais foram feitas com o objetivo de acompanhar a incorporação de matéria orgânicas nos mesmos. As curvas termogravimétricas encontram-se

na figura 13 e as perdas de massa encontram-se na tabela 6. Observa-se uma primeira faixa de perda de massa, até 150 °C, atribuída a dessorção de água da superfície dos xerogéis. A segunda faixa de perda de massa, 150- 650 °C, é atribuída a decomposição de compostos orgânicos e a reações de desidroxilação que ocorrem na superfície da sílica. ((DEON *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2013). Observa-se um aumento na perda de massa na região de decomposição de compostos orgânicos quando se adiciona nanopartículas de ouro aos materiais. Esse aumento é atribuído à decomposição da quitosana utilizada como agente estabilizante das NPs e é de 3,1% para o material MNX1 e de 0,63% para MNX2. Esse resultado condiz com o procedimento experimental realizado, pois para o material MNX1 foi possível oferecer uma maior quantidade de dispersão de nanopartículas, ocorrendo a descoloração do sobrenadante após adsorção das AuNPs na superfície dos xerogéis. Após a imobilização da enzima TLL no material MNX2AuNp foi possível realizar a análise termogravimétrica e, novamente, observa-se um aumento na perda de massa na faixa de 150-650 °C de 2,5% atribuída à decomposição da enzima.

Ademais, observa-se para o material MNX1, o qual possui a maior proporção de óxido de ferro, um aumento de massa entre 300 e 650 °C é observado e atribuído à oxidação dos íons Fe^{2+} da magnetita (CENDROWSKI *et al.*, 2017).

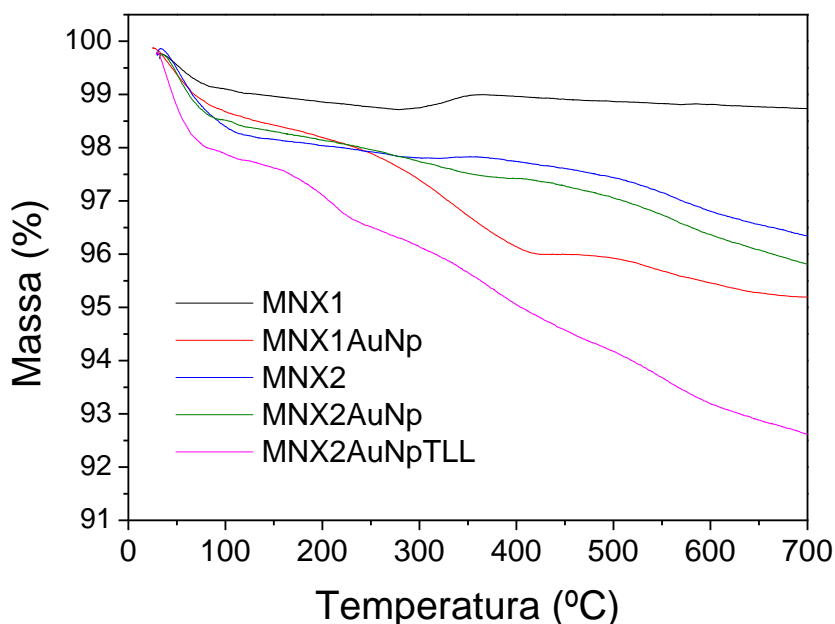


Figura 13: Termogramas obtidos para os xerogéis com e sem AuNp e para o material MNX2AuNp após imobilização da enzima TLL.

Tabela 6: Resultados da análise termogravimétrica dos materiais (perdas de massa em %).

Material	0 – 150 °C	150 – 650 °C
MNX1	0,84	0,20
MNX1AuNp	1,46	3,35
MNX2	1,60	1,60
MNX2AuNp	1,39	2,23
MNX2AuNp TLL	2,15	4,73

6.1.5 Isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio

Com o objetivo de avaliar as propriedades texturais dos materiais MNX1, MNX2, MNX1AuNp e MNX2AuNp, obteve-se isotermas de adsorção e dessorção de N₂ e as distribuições dos diâmetros de poros que se encontram na figura 14 (a), (b), (c) e (d).

Pode-se observar, na figura 14(a) e 14(c), que as isotermas obtidas são classificadas com tipo IV, características de materiais mesoporosos, em que a condensação capilar ocorre em pressões relativamente altas (SING *et al.*, 1985; GREG, SING, 1982). Esse tipo de isoterma é tipicamente obtida quando se utiliza HF como o catalisador na reação de gelificação do método sol-gel (CALDAS *et al.*, 2017). Na figura 15 encontra-se a isoterma do material MNX2AuNp após a imobilização da enzima TLL, juntamente com a isoterma do material antes da imobilização para comparação. Na tabela 7 encontram-se os valores referentes a área superficial específica (S_{BET}) obtida pelo método BET (Brunauer, Emmett e Teller) e os volumes de poros obtidos através do método BJH (Barret, Joyner e Halenda).

A partir da tabela 7 e da figura 15, pode-se observar que o material MNX1 (65% de magnetita) possui área superficial específica (S_{BET}) menor que o material com maior proporção de sílica (MNX2) assim como diâmetro de poros menor, sendo o ponto máximo da curva de distribuição de poros de 12,4 nm para MNX1 e 19,0 nm para MNX2.

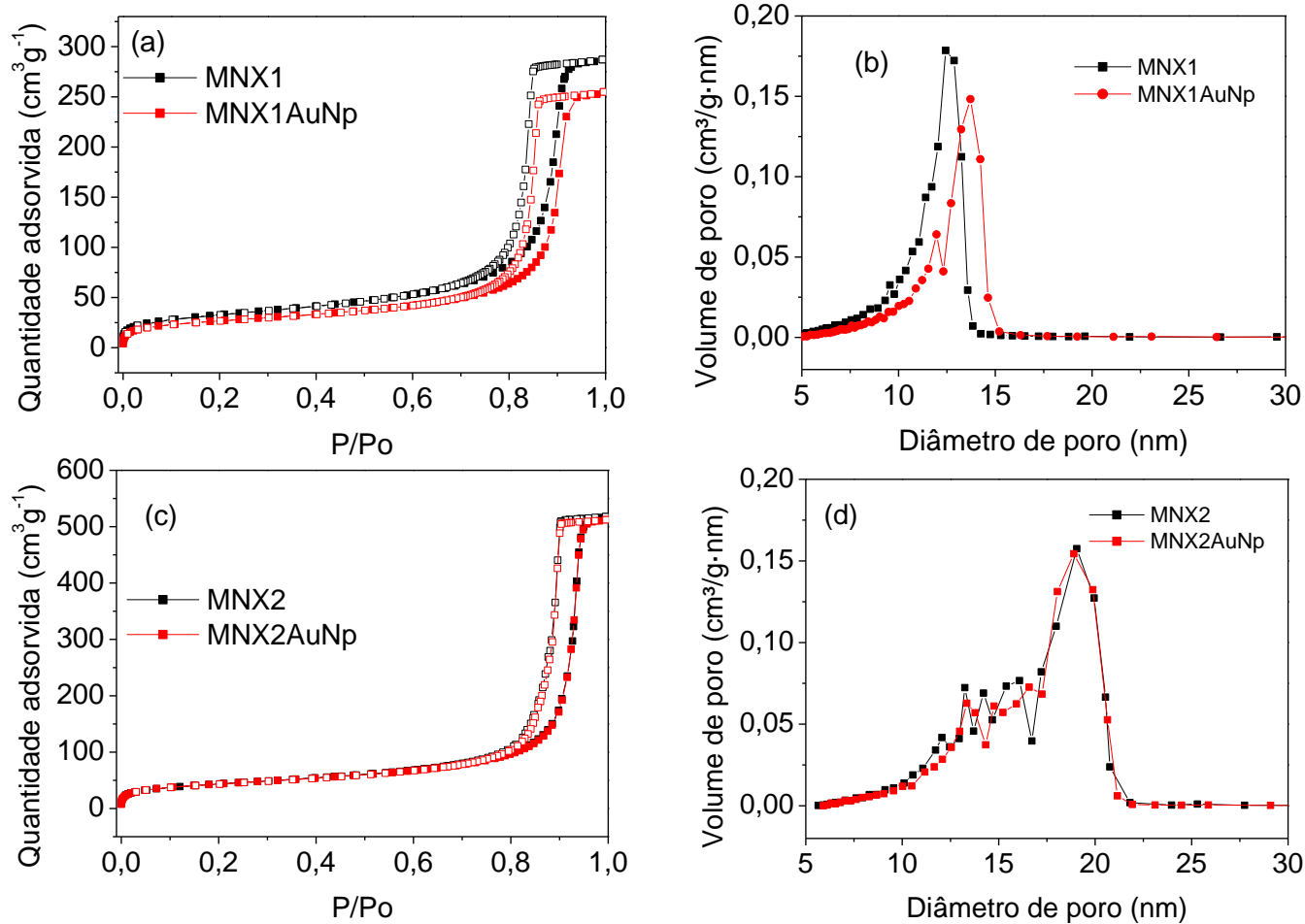


Figura 15: Isothermas de adsorção e dessorção de N₂ dos materiais (a) MNX1 e MNX1AuNp. (c) MNX2 e MNX2AuNp. Distribuição de tamanho de poros das amostras (b) MNX1 e MNX1AuNp e (d) MNX2 e MNX2AuNp.

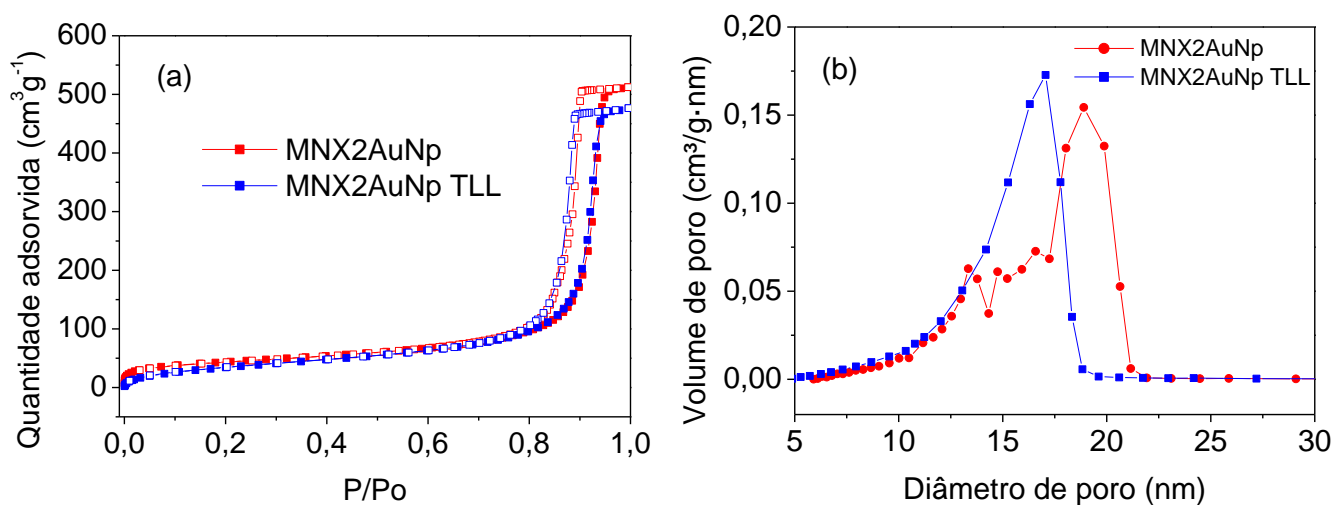


Figura 14: (a) Isothermas de adsorção e dessorção de N₂ dos materiais e (b) distribuição de tamanho de poros das amostras MNX2AuNp e MNX2AuNp TLL.

Tabela 7: Dados da análise textural dos xerogéis.

Material	$S_{\text{BET}} (\pm 5 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1})$	Volume de Poro ($\pm 0,001 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$)
MNX1	115	0,436
MNX2	152	0,774
MNX1AuNp	93	0,389
MNX2AuNp	150	0,761
MNX2AuNp TLL	136	0,718

O acréscimo das nanopartículas de ouro não produziu modificações significativas nas propriedades texturais do material MNX2, já para o material MNX1 houve um decréscimo na área superficial específica, assim como um deslocamento no ponto máximo da curva de distribuição de poros para 13,7 nm. Esses resultados estão em concordância com os resultados de análise termogravimétricas que demonstram uma maior porcentagem de incorporação do agente estabilizante das nanopartículas (quitosana) para o material MNX1. Após a imobilização da enzima lipase no material MNX2AuNp (Figura 14), há uma diminuição na área superficial específica, bem como uma diminuição no volume dos poros e no seu diâmetro (fig. 14 (b)), havendo uma mudança no ponto máximo da curva de distribuição de 19,0 nm para 17,1 nm. Esses resultados indicam que a enzima TLL encontra-se imobilizada nas paredes dos poros do material.

6.2 Medidas de atividade antimicrobiana

Os resultados dos testes de atividade microbiana encontram-se dispostos na tabela 8, sendo a média de triplicatas. É possível observar que os valores de intensidade de turbidez em 600 nm (crescimento celular) foram similares ao controle positivo (meio de cultura e bactérias), portanto os materiais não possuem a capacidade de inibir o crescimento ou causar a morte celular da bactéria *Escherichia coli*. A atividade antimicrobiana das nanopartículas de ouro se dá, principalmente, pelo contato, logo é necessário um contato efetivo entre bactéria e material (HOSENZADEH *et al.*, 2017). Nesse caso, provavelmente o contato entre a bactéria e as nanopartículas não foi suficiente por se tratar de agitação orbital, o que facilitou a aglomeração

dos materiais no fundo dos tubos de ensaio utilizados, além da pouca quantidade de nanopartículas de ouro presentes nos materiais.

Tabela 8: Resultados dos testes de atividade antimicrobiana.

Material	Intensidade de turbidez em 600 nm
MNX1	$0,80 \pm 0,14$
MNX2	$0,94 \pm 0,14$
MNX1AuNp	$0,91 \pm 0,02$
MNX2AuNp	$0,88 \pm 0,04$
Controle Positivo	$0,83 \pm 0,05$
Controle Negativo	0

6.3 Medidas de atividade enzimática

6.3.1 Escolha dos materiais

Primeiramente, um teste preliminar de atividade da enzima imobilizada nos quatro materiais sintetizados: MNX1, MNX2, MNX1AuNp e MNX2AuNp. A imobilização foi realizada sob agitação mecânica moderada durante 12 h, utilizando tampão tris com pH 7,5 para diluir a suspensão de lipase. Os resultados encontram-se sumarizados na tabela 9.

Tabela 9: Resultados dos ensaios de atividade enzimática para a enzima TLL.

Material	Porcentagem de imobilização (%)	Atividade ($U\ g^{-1}$)	Eficiência(%)
MNX1	14	1,95	92
MNX2	18	2,05	75
MNX1AuNp	22	1,85	54
MNX2AuNp	16	2,6	110

Observa-se que o maior valor de atividade foi obtido para as enzimas imobilizadas no material MNX2AuNp, possivelmente pelo material ter diâmetro de poros maior, possibilitando que o sítio ativo da enzima esteja mais exposto ao substrato. Portanto, esse material e seu antecessor (MNX2) foram escolhidos para dar prosseguimento aos estudos de atividade enzimática da lipase suportada nesses materiais.

6.3.2 Otimização dos parâmetros de imobilização no material MNX2AuNp e comparação entre MNX2 e MNX2AuNp

A fim de avaliar a influência dos parâmetros de tempo e pH de imobilização na porcentagem de imobilização e na atividade enzimática da lipase suportada, utilizou-se um planejamento fatorial 2^2 com ponto central (TEÓFILO, FERREIRA, 2006; AOUADA *et al.*, 2008). Os pontos de estudo escolhidos encontram-se na tabela 10.

Tabela 10: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial.

Fator de imobilização	Nível Inferior (-)	Ponto Central (0)	Nível superior (+)
A = Tempo (h)	0,5	15	30
B = pH	5	7	9

Na Tabela 11 é apresentada a matriz planejamento com os valores de atividade obtidos nos diferentes experimentos, sendo que o ponto central é realizado em triplicata e os resultados obtidos para os experimentos de 1 a 4 são médias de duplicatas.

Tabela 11: Matriz planejamento e resultado obtido para os experimentos realizados.

Experimento	Tempo	pH	Atividade (U g ⁻¹)
1	-	-	7,3
2	-	+	3,0
3	+	-	6,9
4	+	+	2,6
5	0	0	2,8
6	0	0	2,2
7	0	0	2,3

Utilizando a tabela para planejamento fatorial 2^2 com ponto central considerando interações entre os fatores desenvolvida por pesquisadores da Universidade Estadual de Campinas (TEÓFILO, FERREIRA, 2006) que contém o teste ANOVA (análise de variância), é possível obter o modelo:

$$Q = 3,86 - 2,15 B$$

A tabela utilizada com os dados deste trabalho encontra-se no anexo A.

Através dessa análise, é possível elucidar que o pH é o único fator significativo entre os fatores estudados para a atividade das enzimas imobilizadas e que a interação entre os fatores (pH e tempo) também não causa alterações significativas nos valores de atividade enzimática. Por intermédio dos resultados obtidos, o pH 5 foi escolhido para dar prosseguimento aos estudos do comportamento de imobilização da lipase nos suportes.

Este resultado está de acordo com o comportamento já reportado na literatura (WANG *et al.*, 2015) para sistemas com quitosana e lipase, pois em pHs baixos, há mais disponibilidade de prótons e, portanto, os grupos amino, constituintes da quitosana que foi utilizada como agente estabilizante, se encontram na forma de NH_3^+ atraindo a enzima lipase que está negativamente carregada em pH 5, pois seu ponto isoelétrico é 4.4 (JHA *et al.*, 1999). Além disso, é comum obter uma maior porcentagem de imobilização perto do ponto isoelétrico pois as enzimas tornam-se menos solúveis (YULIANA, 2014). Os grupos silanóis encontrados na estrutura de sílica também são outro fator importante no mecanismo de imobilização, pois há a possibilidade de formação de ligações de hidrogênio entre os grupos funcionais da enzima e o suporte (KHARRAT *et al.*, 2014).

Para avaliar a possibilidade de utilização de um tempo de imobilização intermediário (entre 0,5 e 30 h), realizou-se novos experimentos utilizando-se 1 h e 15 h de imobilização. Adicionalmente, utilizou-se também o material sem as nanopartículas de ouro, a fim de avaliar sua influência na porcentagem de imobilização e atividade enzimática do biocatalisador proposto. Os resultados encontram-se na tabela 12.

Mediante a análise dos dados contidos na tabela 12, conclui-se que o tempo de 15 h é ideal para a imobilização, pois há um aumento significativo da porcentagem de imobilização, chegando praticamente ao limite de 100% para o material MNX2AuNp.

Observa-se que utilizando as mesmas condições, as porcentagens de imobilizações são maiores para o material que contém as nanopartículas de ouro (MNX2AuNp). Esse resultado indica que com a presença de AuNp há interações eletrostáticas entre os grupos amino positivamente carregados em pH ácido e a lipase negativamente carregada. Essas interações são capazes de diminuir a extensão da lixiviação da enzima nas etapas de lavagem após

imobilização, sendo que o mesmo não ocorre para o material MNX2. Entretanto, observa-se que as atividades enzimáticas são ligeiramente maiores para o material MNX2, isso provavelmente ocorre porque as interações mais fracas entre enzima e suporte levam a manutenção da conformação e a maior exposição dos sítios ativos das enzimas imobilizadas.

Tabela 12: Resultados de porcentagem de imobilização, atividade enzimática e eficiência para o xerogel MNX2 e MNX2AuNp em tempos de imobilização diferentes.

Material	Tempo de imobilização (h)	Porcentagem de imobilização (%)	Atividade (U g ⁻¹)	Eficiência(%)
MNX2	1	34,7	11,3	204
MNX2	15	65,9	8,4	88,7
MNX2AuNp	1	80,1	8,0	60,9
MNX2AuNp	15	97,2	8,0	50,4

6.3.3 Ensaio de reciclo de lipase imobilizada em MNX2 e MNX2AuNp

A fim de avaliar a capacidade de reuso dos biocatalisadores, utilizou-se os parâmetros otimizados (pH = 5 e tempo de imobilização = 15 h) para imobilização da enzima TLL e, após, repetidos ciclos de hidrólise de *p*-nitrofenilpalmitato foram realizados intercalados por enxágues com tampão Tris 0,05 mol L⁻¹ (pH 7,5). Os ensaios foram feitos em triplicata e as médias das atividades relativas são encontradas na figura 16.

Observa-se na figura 16 que a enzima TLL suportada em ambos os materiais apresenta atividade enzimática após utilização em sucessivos ciclos de reação, com perdas de atividade atribuídas à lixiviação da enzima e à possível perda de material durante as lavagens que intercalam os ciclos de reação. Para o material MNX2, aproximadamente 30% da atividade inicial é mantida e para o material MNX2AuNp há a manutenção de cerca de 45% da atividade após 12 ciclos. Essa diferença de atividade mantida para os materiais pode ser atribuída a presença das nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana, que contribuem para a interação entre enzima e suporte e para a afinidade entre o substrato e a enzima (WU *et al.*, 2008).

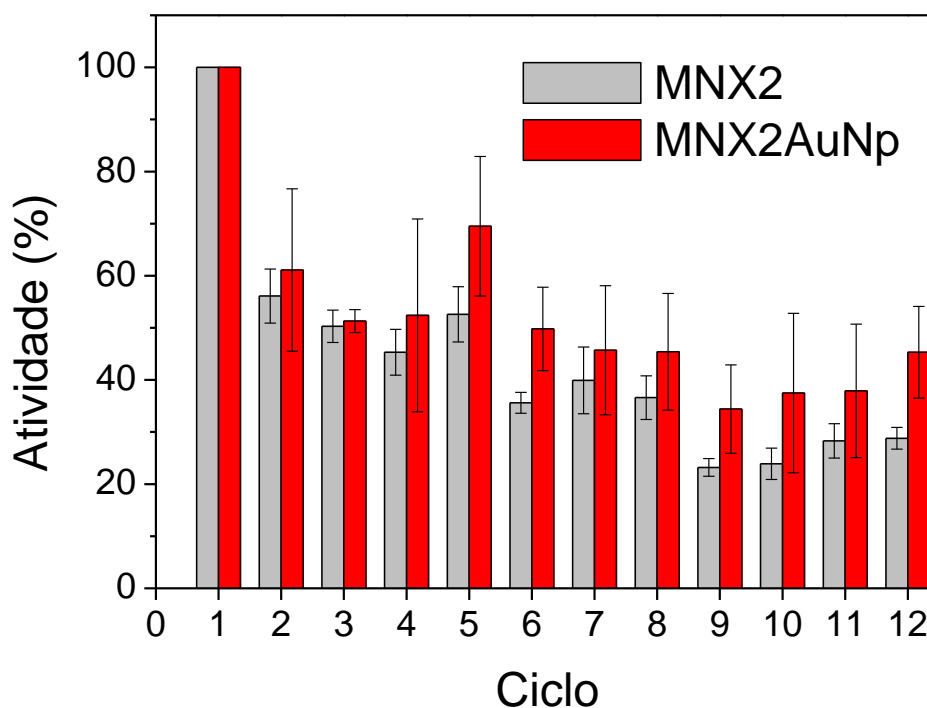


Figura 16: Resultados de reciclo da enzima TLL suportada nos materiais MNX2 e MNX2AuNp. As barras indicam o desvio padrão das triplicatas.

Para a avaliar a estabilidade de estocagem do material, obteve-se a atividade enzimática da lipase imobilizada no material MNX2AuNp ao longo de 16 semanas em alíquotas de material armazenadas a baixa temperatura (aproximadamente 8 °C). Observou-se ao longo de 1 mês (com medidas uma vez por semana) e após 4 meses que a atividade da lipase imobilizada se manteve praticamente inalterada com desvio padrão de 8,6 %. Esse resultado indica que o material aumenta a estabilidade da enzima, podendo ser estocado por longos períodos de tempo após a imobilização.

Na tabela 13, observa-se uma comparação da performance da enzima de *Thermomyces lanuginosus* suportada em outros materiais descritos na literatura.

É possível concluir que o material obtido possui uma excelente porcentagem de imobilização e eficiência, além de ser possível a realização de mais de dez ciclos de reação. Ademais, a metodologia utilizada é mais simples e robusta que as apresentadas na tabela 13. Também cabe ressaltar que o biocatalisador desenvolvido neste trabalho é magnético e, para tanto, não foram necessárias etapas extras de síntese pois utiliza-se magnetita natural, o que é compatível com os princípios da química verde.

Tabela 13: Tabela comparativa entre o suporte desenvolvido neste trabalho e materiais descritos na literatura.

Material	Imobilização (%)	Eficiência (%)	Ciclos	Referência
Nano-tubos de carbono funcionalizados	-	65	50 % após 10 ciclos	VERMA et al., 2013
Partículas de carbono poroso	95	10	100% após 5 ciclos	REICHARDT et al., 2018
Resina com aldeído	32,4	61	-	MENDES et al., 2011
Quitosana modificada	54,9	4,2	82 % após 5 ciclos	BONAZZA et al., 2018
MNX2AuNp	97,2	50,4	45 % após 12 ciclos	Este trabalho

7. CONCLUSÃO

O propósito deste trabalho foi atingido. Foi possível sintetizar novos materiais porosos e magnéticos à base de sílica e magnetita natural, modifica-los com nanopartículas de ouro e aplicá-los na imobilização da enzima lipase.

A partir dos resultados obtidos pelas isotermas de adsorção e dessorção de N₂, observou-se que os materiais são mesoporosos com apreciável área superficial (S_{BET}). Pelas medidas de magnetismo, constata-se que os suportes possuem propriedades magnéticas, logo podem ser facilmente recuperados do meio reacional. Portanto, pode-se inferir que é possível obter materiais magnéticos e porosos (MNX1 e MNX2), utilizando magnetita natural e o método sol-gel de síntese de sílica. Esse procedimento diminui o tempo e os gastos na síntese de suportes magnéticos que empregam magnetita sintética. A incorporação de nanopartículas de ouro estabilizadas por quitosana (MNX1AuNp e MNX2AuNp) é observada através dos espectros na região do UV-Vis e através do aumento da perda de massa na análise termogravimétrica.

Nos testes de atividade antimicrobiana obteve-se resultados negativos, provavelmente devido à pouca quantidade de nanopartículas no material aliada à falta de contato efetivo entre elas e a bactéria gram-negativa *Escherichia coli*.

Nos testes de atividade da enzima lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) suportada, obteve-se o maior valor de atividade enzimática e eficiência para a enzima imobilizada no material MNX2AuNp. Os parâmetros de imobilização foram otimizados através de planejamento fatorial com ponto central 2², obtendo-se pH = 5 e tempo de imobilização de 15 h. Observa-se que o material MNX2AuNp pode ser reutilizado, mantendo *ca.* 45% da atividade inicial, enquanto o material MNX2 mantém aproximadamente 30 % da atividade, esse resultado confirma que a afinidade entre as nanopartículas de ouro reduz a extensão da lixiviação da enzima ao longo dos ciclos. Além disso, a atividade da enzima imobilizada é mantida quando o material é estocado em temperatura baixa por longos períodos de tempo.

Para o material MNX2AuNp também se observa a imobilização da enzima através do aumento da perda de massa na região de decomposição de compostos orgânicos na análise termogravimétrica e na diminuição do diâmetro e volume de poros nas isotermas de adsorção e dessorção de N₂, o que indica que a lipase se encontra imobilizada na parte interna da estrutura de poros.

Portanto, neste trabalho, dois materiais com tamanho de poros diferentes foram sintetizados. Para o material com tamanho de poros menor (MNX1), observa-se uma maior quantidade de AuNp adsorvidas, no entanto, isso não foi determinante para a atividade da enzima imobilizada, cuja eficiência mostrou-se melhor nos materiais com diâmetro de poro

maiores (MNX2 e MNX2AuNp). A presença das nanopartículas de ouro aumentou a eficiência de imobilização e diminuiu a extensão da lixiviação da lipase entre os ciclos de reação.

Conclui-se que foi possível estabelecer uma metodologia robusta e econômica para a síntese de materiais magnéticos que servem como suporte para imobilização de enzimas com potencial aplicação como biocatalisadores.

REFERÊNCIAS

- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 835–841, set. 2002.
- ALI, Z. et al. Micron-sized flower-like Fe₃O₄@GMA magnetic porous microspheres for lipase immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 112, p. 92449–92455, 2015.
- ALMEIDA, V. O. et al. Surfactants for CNTs dispersion in zirconia-based ceramic matrix by sol-gel method. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 65, n. 2, p. 143–149, fev. 2013.
- ANASTAS, P. T., and WARNER, J. C. **Green Chemistry Theory and Practice**. New York: Oxford University Press, 1998. 152 p.
- AOUADA, F. A. et al. Caracterização de hidrogéis condutores constituídos por PAAm e PEDOT/PSS por meio de planejamento fatorial. **Polímeros**, v. 18, n. 2, p. 126–131, jun. 2008.
- BENVENUTTI, E. V. et al. Materiais híbridos à base de sílica obtidos pelo método sol-gel. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1926–1933, 2009.
- BONAZZA, H. L. et al. Operational and thermal stability analysis of *Thermomyces lanuginosus* lipase covalently immobilized onto modified chitosan supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 182–196, jan. 2018.
- BUI, V.; PARK, D.; LEE, Y.-C. Chitosan combined with ZnO, TiO₂ and Ag nanoparticles for antimicrobial wound healing applications: A Mini Review of the Research Trends. **Polymers**, v. 9, n. 12, p. 21, 9 jan. 2017.
- CALDAS, E. M. et al. Pore size effect in the amount of immobilized enzyme for manufacturing carbon ceramic biosensor. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 247, p. 95–102, jul. 2017.
- CAR, H. et al. Gold-functionalized magnetic nanoparticles restrict growth of *Pseudomonas aeruginosa*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 2217–2224, maio 2014.
- CENDROWSKI, K. et al. Chemical and thermal stability of core-shelled magnetite nanoparticles and solid silica. **Applied Surface Science**, v. 407, p. 391–397, jun. 2017.
- CHANG', S.-B. R.; KIRSCHVINK, J. L. Magnetofossils, the magnetization of sediments, and the evolution of magnetite biomineralization. **Annual Review of Earth and Planetary Sciences**, v. 17, p. 169-195, maio 1989.
- CULLITY, B.D. **Elements of X-ray diffraction**. Addison-Wesley Publishing Company: Massachusetts, 1956. 696 p.
- DEON, M. et al. Chitosan-stabilized gold nanoparticles supported on silica/titania magnetic xerogel applied as antibacterial system. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 89, n. 1, p. 333–342, jan. 2019.
- DEON, M. et al. Mesoporous silica xerogel modified with bridged ionic silsesquioxane used to immobilize copper tetrasulfonated phthalocyanine applied to electrochemical determination of dopamine. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 19, n. 7, p. 2095–2105, jul. 2015.

- DIZAJ, S. M. et al. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. **Materials Science and Engineering: C**, v. 44, p. 278–284, nov. 2014.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, jun. 1998.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, mar. 2010.
- FERNANDEZ-MOURE, J. S. et al. Nanoantibiotics: a new paradigm for the treatment of surgical infection. **Nanomedicine**, v. 12, n. 11, p. 1319–1334, jun. 2017.
- GREGG, S.J.; SING, K.S.W. **Adsorption, Surface Area and Porosity**. Academic Press: London, 1982. 303 p.
- HOSEINZADEH, E. et al. A Review on Nano-Antimicrobials: Metal Nanoparticles, Methods and Mechanisms. **Current Drug Metabolism**, v. 18, n. 2, p. 120–128, 21 mar. 2017.
- JHA, B. K. et al. Titration Microcalorimetry Studies of the Interaction between Humicola lanuginosa Lipase and Ionic Surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 213, n. 1, p. 262–264, maio 1999.
- JURADO, E. et al. Enzyme-based detergent formulas for fatty soils and hard surfaces in a continuous-flow device. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 9, n. 1, p. 83–90, mar. 2006.
- KAMAT, S. V.; BECKMAN, E. J.; RUSSELL, A. J. Enzyme Activity in Supercritical Fluids. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 41–71, jan. 1995.
- KANTOUCH, A.; RASLAN, W. M.; EL-SAYED, H. Effect of Lipase Pretreatment on the Dyeability of Wool Fabric. **Journal of Natural Fibers**, v. 2, n. 2, p. 35–48, 31 ago. 2005.
- KAUSAR, A. Polymer and modified chitosan-based nanocomposite: impending material for technical application. **Polymer-Plastics Technology and Materials**, v. 58, n. 9, p. 934–947, 13 jun. 2019.
- KENNEDY, B.A. **Surface Mining**, second ed. Port City Press, Inc. Baltimore, Maryland. 1990 1194 p.
- KETTELER, G. et al. Bulk and surface phases of iron oxides in an oxygen and water atmosphere at low pressure. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 3, n. 6, p. 1114–1122, 2001.
- KHAN, U. S. et al. Transformation mechanism of magnetite nanoparticles. **Materials Science-Poland**, v. 33, n. 2, p. 278–285, 1 jun. 2015.
- KHARRAT, N. et al. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 5, p. 1083–1089, maio 2011.
- LANGFORD, J. I.; WILSON, A. J. C. Scherrer after Sixty Years: A Survey and Some New Results in the Determination of Crystallite Size. **Journal of Applied Crystallography**, v. 11, n. 2, p. 102–113, abr. 1978

- LEIVA, A. et al. Improving the performance of chitosan in the synthesis and stabilization of gold nanoparticles. **European Polymer Journal**, v. 68, p. 419–431, jul. 2015.
- LIU, K.-J.; CHANG, H.-M.; LIU, K.-M. Enzymatic synthesis of cocoa butter analog through interesterification of lard and tristearin in supercritical carbon dioxide by lipase. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1303–1311, jan. 2007.
- 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, maio 2007.
- MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation & Purification Reviews**, p. 1–16, 11 jan. 2019.
- MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, jan. 2011.
- OSONGA, F. J. et al. Greener synthesis and characterization, antimicrobial and cytotoxicity studies of gold nanoparticles of novel shapes and sizes. **RSC Advances**, v. 6, n. 3, p. 2302–2313, 2016.
- PAVLIDIS, I. V. et al. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions: Structural and activity studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1–2, p. 50–56, set. 2009.
- PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L. DE; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106–110, jun. 2005.
- RAMÍREZ, M. Á et al.. Chitin and its derivatives as biopolymers with potential agricultural applications. *Biotecnología Aplicada*, v. 27, n.4, p. 270- 276, dez. 2010.
- REICHARDT, C. et al. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor-made porous carbon material. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 63–73, out. 2018.
- RIVAS-SANCHEZ, M. L. et al. Berthierine and chamosite hydrothermal: genetic guides in the Peña Colorada magnetite-bearing ore deposit, Mexico. **Earth, Planets and Space**, v. 58, n. 10, p. 1389–1400, out. 2006.
- RIVAS-SÁNCHEZ, M. L. et al. Natural magnetite nanoparticles from an iron-ore deposit: size dependence on magnetic properties. **Earth, Planets and Space**, v. 61, n. 1, p. 151–160, jan. 2009.
- RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963–968, set. 2009.
- SALAZAR-CAMACHO, C. et al. Characterization and surface reactivity of natural and synthetic magnetites. **Chemical Geology**, v. 347, p. 233–245, jun. 2013.
- SANCHEZ, S.; DEMAINE, A. L. Enzymes and Bioconversions of Industrial, Pharmaceutical, and Biotechnological Significance. **Organic Process Research & Development**, v. 15, n. 1, p. 224–230, 21 jan. 2011.
- SCHIMID, G. **Nanoparticles: from theory to application**; Wiley: Weinheim, FRG, 2004. p.

218-229

SCHNELL, B. et al. Synthesis of enantiomerically pure 4-aryl-3,4-dihydro- pyrimidin-2(1H)-ones via enzymatic resolution: preparation of the antihypertensive agent (R)-SQ 32926. **Tetrahedron: Assymetry**, v.11, p. 1449-1453, 2000.

SING, K.S.W. et al. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985.

SUN, S.-N. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications. **Chinese Physics B**, v. 23, n. 3, p. 037503, mar. 2014.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, abr. 2006. Planilhas disponíveis em < <http://lqta.iqm.unicamp.br/programasPLAN.html> > Acesso em: 29 jul. 2019.

THOMAS, V. et al. Fabrication, Characterization of Chitosan/Nanosilver Film and Its Potential Antibacterial Application. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 20, n. 14, p. 2129–2144, jan. 2009.

TRAN, D.-T.; CHEN, C.-L.; CHANG, J.-S. Immobilization of Burkholderia sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 112–119, abr. 2012.

TRAN, T.-H.; NGUYEN, T.-D. Controlled growth of uniform noble metal nanocrystals: Aqueous-based synthesis and some applications in biomedicine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 1–22, nov. 2011.

TURAN, S.; KARABULUT, I.; VURAL, H. Effects of reaction parameters on the incorporation of caprylic acid into soybean oil for production of structured lipids. **Journal of Food Lipids**, v. 13, n. 3, p. 306–317, set. 2006.

UNSOY, G. et al. Magnetite: From Synthesis to Applications. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 16, p. 1622–1640, 27 maio 2015.

VAN RANTWIJK, F.; SHELDON, R. A. Biocatalysis in Ionic Liquids. **Chemical Reviews**, v. 107, n. 6, p. 2757–2785, jun. 2007.

VASUDEVAN, P. T.; BRIGGS, M. Biodiesel production—current state of the art and challenges. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, maio 2008.

VERMA, M. L. et al. Enzyme Immobilisation on Amino-Functionalised Multi-Walled Carbon Nanotubes: Structural and Biocatalytic Characterisation. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, p. e73642, 12 set. 2013.




VILLENEUVE, P. et al. Chemoenzymatic synthesis of structured triacylglycerols with conjugated linoleic acids (CLA) in central position. **Food Chemistry**, v. 100, n. 4, p. 1443–1452, jan. 2007.

WANG, X.-Y. et al. Preparation Fe₃O₄@chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 75, p. 44–50, abr. 2015.

WU, C.-S. et al. An enzymatic kinetics investigation into the significantly enhanced activity of functionalized gold nanoparticles. **Chemical Communications**, n. 42, p. 5327 – 5329, 2008.

YULIANA, M. et al. Isolation and characterization of protein isolated from defatted cashew nut shell: Influence of pH and NaCl on solubility and functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, p. 621–626, mar. 2014.

ANEXO – A

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
1	 Planejamento Fatorial Completo 2² com Ponto Central 															
2	Interação de 2³ ordem															
3	Identificação: Atividade enzimática TLL suportada em MNX2AuNp Data: 05/09/2019															
4																
5																
6	Planejamento		Respostas		Estimadas		Efeitos		Erro		t (2)		p			
7	Ensaio	X ₁	X ₂	y	ŷ	SG Média	3,857	±	0,1215	31,75	0					
8	1	-1	-1	7,3	6,2321429	1	-0,4	±	0,32146	1,244	0,34					
9	2	1	-1	6,9	5,7821429	SG 2	-4,3	±	0,32146	13,38	0,01					
10	3	-1	1	3,0	1,8821429	12	0,05	±	0,32146	0,156	0,89					
11	4	1	1	2,6	1,5321429	Nível de significância α: 0,05										
12	5	0	0	2,8	3,8571429											
13	6	0	0	2,2	3,8571429	Parâmetros para a ANOVA										
14	7	0	0	2,3	3,8571429	n° de parâmetros (p) 4										
15	8					n° total de observações (n) 7										
16	9					n° de níveis (m) 5										
17																
18	Análise de Variância - Modelo Linear															
19	FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p										
20	Regressão	18,7	3	6,22	1,719181	0,3336082										
21	Resíduos	10,8	3	3,62												
22	F. Ajuste	10,6	1	10,6	102,99654	SG 0,0095699										
23	Erro Puro	0,21	2	0,1												
24	Total	29,5	6													
25	% variação explicada				63,224221											
26	% máx. de variação explicável				99,299486											

	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC	AD	AE	AF	AG	AH	AI	AJ	AK	AL	AM	AN	AO
1																				
2																				
3	n°	Planejamento (X)				Respostas (y)														
4		Média	x ₁	x ₂	x ₁ x ₂						X'X	X'y	Inv(X'X)							
5	1	1	-1	-1	1	7,3					7	27	0,143	0	0	0				
6	2	1	1	-1	-1	6,85					0	-0,8	0	0,25	0	0				
7	3	1	-1	1	-1	2,95					0	-8,6	0	0	0,25	0				
8	4	1	1	1	1	2,6					0	0,1	0	0	0	0,25				
9	5	1	0	0	0	2,8					0		0	0	0	0				
10	6	1	0	0	0	2,2														
11	7	1	0	0	0	2,3														
12	8																			
13	9																			
14																				
15	Média Total					3,857														
16	Média das Repetições					2,433														
17	Variância no Ponto Central					0,103														
18																				

AP	AQ	AR	AS	AT	AU	AV	AW	AX	AY	AZ	BA	BB	BC	BD	BE	BF	BI
ANOVA																	
	Coefficientes	Erro	t_{calc}	p	Reg.	Total	Falt. Aj	Er.Puro									
SG	b₀	3,857 ± 0,121	31,7	0	5,6406	11,85327	1,1403	0	1	6,2321429	1,067857						
	b₁	-0,2 ± 0,161	1,24	0,34	3,7056	8,957194	1,1403	0	2	5,7821429	1,067857						
SG	b₂	-2,15 ± 0,161	13,4	0,01	3,9006	0,822908	1,1403	0	3	1,8821429	1,067857						
	b₁₂	0,025 ± 0,161	0,16	0,89	5,4056	1,580408	1,1403	0	4	1,5321429	1,067857						
					2E-31	1,117551	2,0272	0,13444	5	3,8571429	-1,057143						
					2E-31	2,746122	2,0272	0,05444	6	3,8571429	-1,657143						
					2E-31	2,424694	2,0272	0,01778	7	3,8571429	-1,557143						
									8								
									9								
					18,653	29,50214	10,643	0,20667	Média	3,8571429							

Figura 17: Tabelas originais utilizadas para o planejamento fatorial 2^2 com ponto central.