



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA**

**INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE**

ISAMAYRA GERMANO DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS
UTILIZANDO SUPORTES HÍBRIDOS DE QUITOSANA E AGAROSE
CONTENDO LIPASE EVERSAR[®] TRANSFORM 2.0 E SUA APLICAÇÃO NA
SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTES**

REDENÇÃO – CE

2022

ISAMAYRA GERMANO DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS
UTILIZANDO SUPORTES HÍBRIDOS DE QUITOSANA E AGAROSE
CONTENDO LIPASE Eversa® TRANSFORM 2.0 E SUA APLICAÇÃO NA
SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente, do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ada Amélia Sanders Lopes

REDENÇÃO – CE

2022

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Sousa, Isamayra Germano de.

S725d

Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos utilizando suportes híbridos de quitosana e agarose contendo lipase Eversa® Transform 2.0 e sua aplicação na síntese de biolubrificantes / Isamayra Germano de Sousa. - Redenção, 2022.
124f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, Programa de Pós-graduação em Energia e Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2022.

Orientador: Prof.º Dr.º José Cleiton Sousa dos Santos.
Coorientador: Prof.ª Dr.ª Ada Amélia Sanders Lopes.

1. Imobilização enzimática. 2. Quitosana. 3. Agarose. 4. Biolubrificantes. I. Lopes, Ada Amélia Sanders. II. Título.

CE/UF/BSCA

CDD 662.756

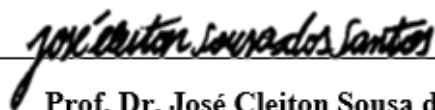
ISAMAYRA GERMANO DE SOUSA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS
UTILIZANDO SUPORTES HÍBRIDOS DE QUITOSANA E AGAROSE
CONTENDO LIPASE Eversa® TRANSFORM 2.0 E SUA APLICAÇÃO NA
SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente, do Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Energia e Ambiente.

Aprovada em: 26/07/2022

BANCA EXAMINADORA



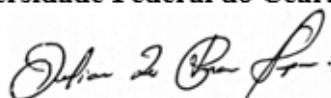
Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)
(Orientador)



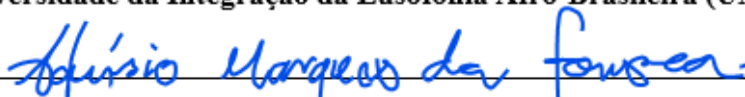
Prof.^a Dr.^a Ada Amélia Sanders Lopes
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)
(Co-orientadora)



Prof.^a Dr.^a Maria Alexandra de Sousa Rios
Universidade Federal do Ceará (UFC)



Prof.^a Dr.^a Juliana de França Serpa
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)



Prof. Dr. Aluisio Marques da Fonseca
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

A Deus, aos meus pais Juarez e Regina, a minha irmã Ester, ao meu esposo Pedro, aos meus grandes amigos e companheiros de jornada

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, do qual eu sou completamente dependente, pelo privilégio da vida e pela sua bondade e misericórdia tão infinitas que me fizeram chegar até aqui; pelo sustento e sabedoria me concedidos todos os dias dessa caminhada.

Aos meus pais que sempre me deram todo suporte e que nunca mediram esforços para me fazer crescer e evoluir. Que sempre me ensinaram sobre disciplina, educação e persistência, sendo os maiores contribuintes da minha formação humana. Por se fazerem presentes em todos os momentos da minha vida sempre com muito amor e carinho. Essa conquista é uma pequena retribuição por tanto cuidado e incentivo.

Ao meu esposo Pedro Henrique, por todo apoio e paciência nessa trajetória; pelo seu enorme companheirismo e auxílio; por tornar os momentos difíceis mais leves com seu amor, com sua alegria e com sua presença.

Aos meus amigos, que sempre vibraram comigo em cada conquista da minha vida, que sempre se fizeram presentes e que sempre estiveram prontos para me ajudar em todas as situações.

A minha grande companheira de curso Gabrielly Ferreira Mota, que me acolheu e me auxiliou durante todo o mestrado, e que sempre esteve pronta para me ajudar. Sem dúvidas, foi uma pessoa essencial nesse processo. Assim também, agradeço aos meus companheiros de laboratório André, Katerine e Luthierre, pela parceria e ajuda nos trabalhos laboratoriais.

Ao meu orientador prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, pela confiança a mim depositada, por todas as instruções, pelo incentivo, pela compreensão nos momentos de limitações. Esse processo não teria acontecido sem a sua orientação, sem o seu conhecimento e sem o seu profissionalismo.

A minha querida UNILAB que fez parte da minha formação desde a graduação. Me sinto privilegiada por ter estudado em uma universidade tão incrível, com excelentes profissionais que lutam todos os dias por educação de excelência. Ao grupo GENEZ que me acolheu desde o início, agradeço pela parceria.

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

“A sabedoria dos homens é proporcional não à sua experiência, mas à sua capacidade de adquirir experiência.”

George Bernard Shaw

RESUMO

Neste estudo a lipase Eversa® Transform 2.0 (EVS) foi imobilizada em um suporte híbrido formado por quitosana (QUI) e agarose (AGA) através do método de ligação covalente, utilizando o glutaraldeído (GA) como agente ativador. O processo foi otimizado pelo método Taguchi e sob condições otimizadas (5mM, 1 hora, GA 1% e carga de 5mg de enzima por grama de suporte), o biocatalisador produzido apresentou atividade de $74,39 \pm 0,48$ U/g e rendimento de imobilização de $74,20 \pm 0,28\%$. O biocatalisador produzido foi caracterizado por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que indicaram a junção QUI/AGA, a incorporação de glutaraldeído ao suporte e a imobilização da lipase na matriz. O biocatalisador também foi avaliado quanto ao seu desempenho em diferentes temperaturas e pH's em comparação à enzima solúvel, e ainda foram realizados testes de capacidade de carga do suporte, dessorção, capacidade de armazenamento e efeito de diferentes solventes. O biocatalisador produzido perdeu apenas 15,3% da sua atividade após 61 dias de armazenamento, teve sua atividade elevada em $96,70\% \pm 0,76$, $27,34\% \pm 2,34$ e $84,35\% \pm 1,68$ na presença dos solventes orgânicos hexano, ciclohexano e metanol, respectivamente, apresentou maior atividade em temperaturas acima de 50°C e ainda reteve quase 30% de sua atividade total em 70°C, enquanto a enzima livre praticamente já não tinha mais atividade significativa. No estudo do efeito do pH, percebeu-se que a imobilização contribuiu para o aumento da atividade enzimática em pH's alcalinos, elevando a atividade da Eversa® Transform 2.0 até 140% em pH 9. O ensaio de dessorção revelou que não houve desprendimento enzimático do suporte mesmo após 60 min na presença de tampão 25mM pH 7, NaCl 1M e Triton X-100 0,1% (v/v). Por fim, o suporte QUI/AGA apresentou o derivado de maior atividade em uma carga máxima de 23mg de enzima por g de suporte. O biocatalisador mostrou-se satisfatório na síntese de biolubrificantes alcançando uma conversão de 40,3% e os espectros de RMN revelaram sinais característicos de um éster metílico. Os estudos de docking molecular apresentaram as estruturas da lipase e mostraram que o ácido oleico pode se ligar próximo ao sítio ativo da enzima com a melhor energia livre de -5,4 kcal/mol. Nesse contexto, o estudo revelou um novo biocatalisador QUI/AGA/GLU/EVS, com excelentes propriedades e com características promissoras na síntese de biolubrificantes.

Palavras-chave: Eversa® Transform 2.0. Imobilização enzimática. Quitosana. Agarose. Biolubrificantes.

ABSTRACT

In this study, Eversa® Transform 2.0 lipase (EVS) was immobilized on a hybrid support formed by chitosan (QUI) and agarose (AGA) through the covalent bonding method, using glutaraldehyde (GA) as an activating agent. The process was optimized by the Taguchi method and under optimized conditions (5mM, 1 hour, 1% GA and 5mg of enzyme load per gram of support), the biocatalyst produced showed an activity of 74.39 ± 0.48 U/g and a yield of immobilization of $74.20 \pm 0.28\%$. The biocatalyst produced was characterized by X-Ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetry (TGA), Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and Scanning Electron Microscopy (SEM), which indicated the junction QUI/AGA, the incorporation of glutaraldehyde to the support and the immobilization of lipase in the matrix. The biocatalyst was also evaluated for its performance at different temperatures and pH's compared to the soluble enzyme, and tests were also carried out on the load capacity of the support, desorption, storage capacity and effect of different solvents. The biocatalyst produced lost only 15.3% of its activity after 61 days of storage, its activity was increased by $96.70\% \pm 0.76$, $27.34\% \pm 2.34$ and $84.35\% \pm 1.68$ in the presence of the organic solvents hexane, cyclohexane and methanol, respectively, showed higher activity at temperatures above 50°C and still retained almost 30% of its total activity at 70°C, while the free enzyme practically no longer had significant activity. In the study of the effect of pH, it was noticed that the immobilization contributed to the increase of the enzymatic activity in alkaline pH's, increasing the activity of Eversa® Transform 2.0 up to 140% in pH 9. The desorption assay revealed that there was no enzymatic detachment of the support even after 60 min in the presence of 25mM buffer pH 7, 1M NaCl and 0.1% Triton X-100 (v/v). Finally, the QUI/AGA support showed the highest activity derivative at a maximum load of 23mg of enzyme per g of support. The biocatalyst proved to be satisfactory in the synthesis of biolubricants reaching a conversion of 40.3% and the NMR spectra revealed characteristic signals of a methyl ester. Molecular docking studies showed the lipase structures and showed that oleic acid can bind close to the active site of the enzyme with the best free energy of -5.4 Kcal/mol. In this context, the study revealed a new biocatalyst QUI/AGA/GLU/EVS, with excellent properties, low cost and with promising characteristics in the synthesis of biolubricants.

Keywords: Eversa® Transform 2.0. Enzymatic immobilization. Chitosan. Agarose. Biolubricants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vantagens do uso de biolubrificantes.	28
Figura 2 - Percentual de produção anual das matérias-primas utilizadas em biolubrificantes.	32
Figura 3 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (código PDB:1DT3; 1GT6); sítio ativo (resíduos Ser146, His258, Asp201 em preto). Todas as estruturas foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando o pymol educacional.	37
Figura 4 - Métodos tecnológicos de imobilização de enzimas.	42
Figura 5 - Reação de síntese de biolubrificantes por esterificação.	48
Figura 6 - Representação esquemática do processo de transesterificação.	50
Figura 7 - Reação de hidroesterificação.	52
Figura 8 - A relação S/N representa o tempo, força iônica, pH e proteína de carga para otimização da imobilização CALA-CALB-QUI.	95
Figura 9 - Superfície de contorno para a imobilização de QUI/AGA/GLU/EVS, demonstrando carga de proteína (mg/g) versus concentração de GLU (%), levando em consideração a atividade do biocatalisador como resposta.	95
Figura 10 - Teste de capacidade de carga do suporte QUI/AGA para a lipase em 5mM, Concentração de GLU 1%, carga de proteína 1-50mg/g durante 1h.	98
Figura 11 - Estabilidade de QUI/AGA/GLU/EVS em armazenamento durante 61 dias, sob 4°C.	99
Figura 12 - Efeito da temperatura sobre as enzimas na forma solúvel e imobilizada. .	100
Figura 13 - Efeito do pH sobre as enzimas livre e imobilizada.	101
Figura 14 - Teste de estabilidade do biocatalisador QUI/AGA/GLU/EVS em solventes orgânicos.	102
Figura 15 - Padrão de XRD de: (a) QUI, (b) AGA, (c) QUI / AGA, (d) QUI / AGA / GLU e (e) QUI / AGA / CLU / EVS.	104
Figura 16 - Espectros de FTIR para (a) QUI, (b) AGA, (c) QUI / AGA, (d) QUI/ AGA / GLU e (e) QUI / AGA / GLU / EVS.	105

Figura 17 - Micrografias MEV de mapas de amostras / EDS para (a / f) AGA, (b / g) QUI, (c / h) QUI / AGA, (d / i) QUI / AGA / GLU e (e / j) QUI / AGA / GLU / EVS.	107
Figura 18 - Análise de TGA (a) e o DTG (b) das amostras QUI, AGA, QUI / AGA, QUI / AGA / GLU e QUI / AGA / GLU / EVS.	108
Figura 19 - Espectro de caracterização do ácido oleico. ¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 5.57 – 5.16 (m, 2H), 2.34 (t, 2H), 1.76 – 1.53 (m, 2H), 1.29 (d, 24H), 0.9 (t, 3H).....	109
Figura 20 - Espectro de caracterização do biolubrificante. ¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) δ 5.37 – 5.31 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.30 (t, J = 7.5 Hz, 2H), 1.64 – 1.61 (m, 2H), 1.31 – 1.29 (m, 24H), 0.89 (t, 3H).....	110
Figura 21 - Gráfico Ramachandran padronizado da Eversa.....	112
Figura 22- Detecção de sete cavidades por CASTp.	113
Figura 23 - Reação de esterificação de ácido oleico e álcool com a Eversa®Transform 2.0.	113
Figura 24 - Interações do ácido oleico entre a tríade catalítica da Eversa lipase Ser153-His268-Asp206 (azul) e resíduos de aminoácidos.	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Álcoois de cadeia longa para produção de biolubrificantes usando lipases..	46
Tabela 2 - Tabela 1 - Fatores independentes e seus respectivos níveis para a imobilização EVS - QUI/AGA/GLU.	87
Tabela 3 - Desenho de matriz ortogonal L9 junto com os valores de atividade QUI/AGA/GLU/EVS e as razões S/N.	94
Tabela 4 - Tabela de resposta das relações S/R.	96
Tabela 5 - Dessorção da EVS imobilizada em QUI/AGA/GLU em uma concentração de 5mg/g de suporte, incubados durante 1h nas condições de 25°C e pH7, sob agitação mecânica moderada.	103

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1

1.1. INTRODUÇÃO.....	17
1.2. OBJETIVOS GERAIS	20
1.2.1. <i>Objetivos Específicos</i>	20
1.3. REFERÊNCIAS.....	21

CAPÍTULO 2

2.1. RESUMO	26
2.2. INTRODUÇÃO.....	27
2.3. BIOLUBRIFICANTES	29
2.3.1. <i>Propriedades do Biolubrificante</i>	29
2.3.2. <i>Matéria-prima dos biolubrificantes</i>	30
2.4. ENZIMAS.....	35
2.4.1. <i>Lipases</i>	37
2.4.2. <i>Propriedades das lipases</i>	38
2.4.3. <i>Imobilização de lipases</i>	39
2.4.4. <i>Fatores de influência na imobilização enzimática</i>	40
2.5. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	41
2.5.1. <i>Encapsulamento</i>	42
2.5.2. <i>Adsorção física</i>	43
2.5.3. <i>Ligação covalente</i>	43
2.5.4. <i>Cross-linking</i>	44
2.6. ÁLCOOL NA PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES CATALISADOS POR LIPASE.....	45
2.7. PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES COM LIPASE	47
2.7.1. <i>Processo de esterificação</i>	47
2.7.2. <i>Processo de transesterificação</i>	49
2.7.3. <i>Processo de hidroesterificação</i>	51
2.8. PROJETOS DE BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE DE LIPASE.....	53
2.9. TENDÊNCIAS FUTURAS	55
2.10. REFERÊNCIAS.....	57

CAPÍTULO 3

3.1. RESUMO	82
3.2. INTRODUÇÃO.....	83

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS	86
3.3.1. <i>Materiais</i>	86
3.3.2. <i>Métodos</i>	86
3.3.3. <i>Preparação do suporte híbrido de quitosana/agarose</i>	86
3.3.4. <i>Ativação do suporte com Glutaraldeído (GLU)</i>	86
3.3.5. <i>Projeto experimental para a imobilização da Eversa® Transform 2.0</i> .	87
3.3.6. <i>Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína</i>	88
3.3.7. <i>Parâmetros de imobilização</i>	88
3.3.8. <i>Capacidade de carga do suporte na imobilização da lipase</i>	89
3.3.9. <i>Estabilidade de armazenamento da lipase imobilizada</i>	89
3.3.10. <i>Efeito do pH na lipase solúvel e imobilizada</i>	89
3.3.11. <i>Efeito da temperatura de reação na atividade da enzima livre e imobilizada</i>	89
3.3.12. <i>Atividade em solventes orgânicos</i>	90
3.3.13. <i>Testes de dessorção do biocatalisador</i>	90
3.3.14. <i>Caracterização de materiais</i>	90
3.3.15. <i>Produção enzimática de ésteres de 2-etil-1-hexanol via esterificação</i> ...	91
3.3.16. <i>Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</i>	91
3.3.17. <i>Docking Molecular</i>	91
3.3.18. <i>Modelagem de homologia</i>	91
3.3.19. <i>Identificação e seleção da proteína modelo</i>	91
3.3.20. <i>Alinhamento de sequências de alvo e molde</i>	92
3.3.21. <i>Construção e otimização de modelos</i>	92
3.3.22. <i>Validação de proteínas</i>	92
3.3.23. <i>Preparação de proteína</i>	92
3.3.24. <i>Obtenção do ligante</i>	92
3.3.25. <i>Docking molecular e visualização de cálculos</i>	93
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
3.4.1. <i>Otimização da imobilização da Eversa Transform 2.0 no suporte híbrido QUI/AGA</i>	94
3.4.2. <i>Capacidade de carga do suporte para imobilização da lipase e capacidade de armazenamento do biocatalisador produzido</i>	97
3.4.3. <i>Estabilidade térmica e de pH</i>	99
3.4.4. <i>Estabilidade em solventes orgânicos e teste de dessorção da enzima</i> ..	101
3.4.5. <i>Caracterização de materiais</i>	103
3.4.6. <i>Produção de ésteres por biocatálise</i>	110

3.4.7.	<i>Docking molecular</i>	111
3.4.8.	<i>Modelagem de proteínas</i>	111
3.4.9.	<i>Interação entre o suporte e a lipase</i>	112
3.5.	CONCLUSÕES	115
3.6.	REFERÊNCIAS	116

CAPÍTULO 1

Introdução e objetivos

1.1.INTRODUÇÃO

As enzimas têm sido frequentemente utilizadas como biocatalisadores bastante versáteis, sendo caracterizadas como macromoléculas biológicas que possuem propriedades como quimio, regio e estéreo especificidade. Além disso, podem ser aplicadas em condições de reação moderadas, demonstrando possibilidade de utilização crescente em diversas áreas (BORNSCHEUER, 2003; DROUT; ROBISON; FARHA, 2019; KIM et al., 2017; KOHEN, 2015; NAZOR; LIU; HUISMAN, 2021). São biodegradáveis, não tóxicas e não perigosas, evitando a contaminação ambiental por resíduos de catalisadores, além de apresentarem disponibilidade e custos relativamente estáveis, por serem recursos renováveis baratos. (SHELDON; BRADY, 2021; SHELDON; VAN PELT, 2013; TRUPPO, 2017).

As lipases (EC 3.1.1.3) estão no grupo das hidrolases, que são enzimas capazes de catalisar a hidrólise e síntese de triglicerídeos de cadeia longa para ácidos graxos, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol, além de reações de interesterificação, esterificação, aminólise e alcoólise (CASAS-GODOY; DUQUESNE; BORDES, 2012; CHANDRA et al., 2020; ELIAS et al., 2021; GHASEMI et al., 2021; ROCHA et al., 2020; VALÉRIO et al., 2022). Podem ter origem através de animais, plantas e microrganismos, apresentando diferentes níveis de atividade, estabilidade e seletividade de substrato (CONTESINI et al., 2020; GUERRAND, 2017; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004). A Eversa® Transform 2.0, foi introduzida recentemente, no ano de 2016, pela Novozymes, sendo uma lipase líquida derivada de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificado e expressa em *Aspergillus oryzae*, com 269 resíduos de aminoácidos na sequência primária, apresentando baixo custo, alta especificidade para matérias-primas e alta atividade em condições amenas (CHANG; CHAN; SONG, 2021; FRAGA et al., 2019; LI et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021a).

Apesar do grande potencial, as aplicações industriais das enzimas foram dificultadas principalmente devido à propriedade indesejável em termos de baixa estabilidade e eficiência catalítica (CHOI; HAN; KIM, 2015; ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021). Para superar essas deficiências, diferentes abordagens foram testadas, incluindo processos de imobilização, que além de permitirem a recuperação, fornecem maior estabilidade, tornando as enzimas mais robustas e resistentes à reações em condições mais severas (CAO, 2005; CHOI; HAN; KIM, 2015; FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; NERY; KUBOTA, 2016). Dessa forma, algumas técnicas de

imobilização com diferentes desvantagens e vantagens, dependendo da reação e da enzima, foram descritas, sendo categorizadas em aprisionamento, adsorção, reticulação e ligação covalente (AGHAEI; YASINIAN; TAGHIZADEH, 2021; BEZERRA et al., 2015; BICKERSTAFF, 2003; REIS et al., 2019a).

O tipo de suporte utilizado também possui impacto significativo na imobilização da enzima (WAHAB et al., 2020; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Alguns de seus aspectos importantes são área de superfície, tamanho de partícula, carga superficial, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, funcionalização de superfície, estabilidade mecânica química e porosidade do material (LIU et al., 2021; XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022). Dessa forma, uma variedade de materiais, desde orgânicos, inorgânicos e híbridos têm sido explorados para uso como suporte em imobilizações enzimáticas (BENÍTEZ-MATEOS; CONTENTE, 2021; PANDEY; DAVEREY; ARUNACHALAM, 2020; ZDARTA et al., 2018)

A quitosana aparece como o segundo biopolímero mais abundante e um dos materiais de suporte mais amplamente usados para imobilizações enzimáticas em decorrência do seu baixo custo, disponibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e hidrofiliabilidade, propriedades de adsorção e capacidade de desenvolver filmes e quelatos de íons metálicos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; POURMADADI et al., 2021; VERMA et al., 2020; XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022). Já a agarose é um polímero heteropolissacarídeo linear, capaz de fornecer um microambiente eficiente para uma reação enzima-substrato, além de facilitar a liberação de produtos no meio de reação e possuir uma grande capacidade de gelificação a uma temperatura abaixo de 35°C com a adição de quaisquer íons, resultando no desenvolvimento de estruturas estabilizadas e rígidas (SAEEDI GARAKANI et al., 2020; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

Todo protocolo de imobilização deve considerar aspectos como propriedades do suporte, o grupo ativo do suporte e da molécula de enzima, bem como o próprio protocolo de imobilização, pois a partir da seleção adequada desses três aspectos é possível tirar o máximo proveito do processo de imobilização (BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020; KUJAWA et al., 2021; MOEHLENBROCK; MINTEER, 2017). Nesse contexto, a biocatálise pode ser um caminho promissor, por exemplo, para reduzir o impacto causado pelos derivados de petróleo.

Atualmente, os lubrificantes à base de petróleo têm dominado o mercado, atuando como agentes lubrificantes universais para a maioria das aplicações industriais, comerciais e pessoais (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Entretanto, a indústria de lubrificantes consome muitos recursos fósseis sendo prejudiciais por sua toxicidade (IVAN-TAN et al., 2017; SALIH; SALIMON, 2021). Dessa forma, uma abordagem alternativa, que contribui para a redução do impacto causado pelos derivados do petróleo e seu impacto antropogênico ao meio ambiente é o uso de lubrificantes obtidos a partir de óleos vegetais (FERREIRA et al., 2020; MCNUTT; HE, 2016).

O interesse pelos biolubrificantes cresceu porque são biodegradáveis e apresentam baixa ecotoxicidade em comparação com os lubrificantes à base de óleo mineral (KIM et al., 2019). A biocatálise oferece uma excelente alternativa para sua produção com propriedades promissoras, como condições de reação moderadas e configurações de reatores altamente seletivas, que simplificam a integração do processo (BARBOSA et al., 2021). As reações enzimáticas geralmente aumentam a eficiência energética e produzem menos resíduos do que as rotas convencionais. Além disso, as enzimas são renováveis, não tóxicas e não perigosas (AFIFAH et al., 2021; MCNUTT; HE, 2016).

Portanto, este trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo biocatalisador produzido a partir da imobilização via ligação covalente da lipase Eversa® Transform 2.0, bem como sua aplicação na síntese de biolubrificantes. Os resultados estão apresentados em capítulos. O capítulo 2 apresenta um artigo de revisão sobre a produção de biolubrificantes catalisada por lipases, já o capítulo 3 aborda a preparação do biocatalisador híbrido, bem como estudos de estabilidade e caracterização, e a sua aplicação na síntese de biolubrificantes.

1.2. OBJETIVOS GERAIS

Produzir um biocatalisador híbrido a partir da imobilização covalente da lipase Eversa® Transform 2.0 no suporte de quitosana e agarose, e avaliar suas condições de aplicação na produção de ésteres biolubrificantes.

1.2.1. Objetivos Específicos

- Comprovar a eficácia do método Taguchi quanto à otimização experimental.
- Analisar o biocatalisador produzido quanto ao seu comportamento em diferentes temperaturas, pH's e solventes, bem como a sua capacidade de armazenamento.
- Avaliar a capacidade do suporte QUI/AGA/GLU quanto a carga máxima suportada de lipase, bem como o não desprendimento da enzima deste.
- Caracterização do suporte antes e após a imobilização.
- Realizar estudos de docking molecular
- Avaliar o desempenho do biocatalisador produzido na síntese de ésteres biolubrificantes

1.3.REFERÊNCIAS

AFIFAH, A. N. et al. Synthesis and tribological studies of epoxidized palm stearin methyl ester as a green lubricant. **Journal of Cleaner Production**, v. 280, 2021.

AGHAEI, H.; YASINIAN, A.; TAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 178, p. 569–579, 2021.

BARBOSA, M. S. et al. Biolubricant production under zero-waste *Moringa oleifera* Lam biorefinery approach for boosting circular economy. **Industrial Crops and Products**, v. 167, n. November 2020, 2021.

BENÍTEZ-MATEOS, A. I.; CONTENTE, M. L. Agarose vs. Methacrylate as material supports for enzyme immobilization and continuous processing. **Catalysts**, v. 11, n. 7, 2021.

BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells: Some Practical Considerations. **Immobilization of Enzymes and Cells**, v. 1, p. 1–12, 2003.

BOLINA, I. C. A.; GOMES, R. A. B.; MENDES, A. A. Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: Current Scenario and Future Perspectives. **Bioenergy Research**, 2021.

BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 29, p. 3336–3337, 2003.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, n. November 2019, p. 66–80, 2020.

CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.

CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F. Lipases and Phospholipases. **Methods Mol Biol**, v. 861, p. 3–30, 2012.

CHANDRA, P. et al. **Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review**. [s.l.] BioMed Central, 2020. v. 19

CHANG, M. Y.; CHAN, E. S.; SONG, C. P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase methanol tolerance and kinetic model. **Fuel**, v. 283, n. October 2020, 2021.

CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, nov. 2015.

CONTESINI, F. J. et al. Advances in recombinant lipases: application in the pharmaceutical industry. **Catalysts**, v. 10, p. 1–33, 2020.

- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.
- DROUT, R. J.; ROBISON, L.; FARHA, O. K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 381, p. 151–160, 2019.
- ELIAS, N. et al. Taguchi orthogonal design assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto nanocellulose-silica reinforced polyethersulfone membrane: physicochemical characterization and operational stability. **Cellulose**, v. 28, n. 9, p. 5669–5691, 2021.
- FERREIRA, A. R. O. et al. Sulfonated activated carbons as potential catalysts for biolubricant synthesis. **Molecular Catalysis**, v. 488, n. January, p. 110888, 2020.
- FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.
- FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 653–658, 2019.
- GHASEMI, S. et al. Covalent binding and in-situ immobilization of lipases on a flexible nanoporous material. **Process Biochemistry**, v. 102, n. July 2020, p. 92–101, 2021.
- GUERRAND, D. Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 24, n. 4, 2017.
- HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: An overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.
- ISMAIL, A. R.; KASHTOH, H.; BAEK, K. H. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, n. May, p. 127–142, 2021.
- IVAN-TAN, C. T. et al. Screening of solid base catalysts on palm oil based biolubricant synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 148, p. 441–451, 2017.
- KIM, H. et al. Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. **Renewable Energy**, v. 130, p. 489–494, 2019.
- KIM, T. H. et al. The role of dimer asymmetry and protomer dynamics in enzyme catalysis. **Science**, v. 355, n. 6322, 2017.
- KOHEN, A. Role of dynamics in enzyme catalysis: Substantial versus semantic controversies. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 2, p. 466–473, 2015.
- KUJAWA, J. et al. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. **Science of the Total Environment**, v. 801, 2021.
- LI, B. et al. Biodiesel preparation from high acid value phoenix seed oil using Eversa transform 2.0 as a novel catalyst. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 4, 2021.
- LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices

– A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, n. August, p. 396–408, 2021.

MCNUTT, J.; HE, Q. S. Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, p. 1–12, 2016.

MOEHLENBROCK, M. J.; MINTEER, S. D. Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. **Methods in Molecular Biology**, v. 1504, p. 1–7, 2017.

MONTEIRO, R. R. C. et al. **Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?** **Renewable Energy**, 2021.

NAZOR, J.; LIU, J.; HUISMAN, G. Enzyme evolution for industrial biocatalytic cascades. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 182–190, 2021.

NERY, E. W.; KUBOTA, L. T. Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices-A glucose oxidase study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 551–559, 2016.

PANDEY, D.; DAVEREY, A.; ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, p. 120267, 2020.

POURMADADI, M. et al. The synthesis and characterization of double nanoemulsion for targeted Co-Delivery of 5-fluorouracil and curcumin using pH-sensitive agarose/chitosan nanocarrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102849, 2021.

REIS, C. C. L. B. C. et al. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, n. 0123456789, 2020.

SAEEDI GARAKANI, S. et al. Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 533–545, 2020.

SALIH, N.; SALIMON, J. A review on eco-friendly green biolubricants from renewable and sustainable plant oil sources. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 13303–13327, 2021.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Streamlining design, engineering, and applications of enzymes for sustainable biocatalysis. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 24, p. 8032–8052, 2021.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 5, p. 476–480, 2017.

VALÉRIO, R. B. R. et al. Understanding the biocatalytic potential of lipase from *Rhizopus chinensis*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 4230–4260, 2022.

VERMA, M. L. et al. **Chitin and chitosan-based support materials for enzyme**

immobilization and biotechnological applications *Environmental Chemistry Letters*, mar. 2020.

WAHAB, R. A. et al. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, n. February, p. 104613, 2020.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, n. 7, p. 27–35, 2022.

ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 24 fev. 2018.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.

CAPÍTULO 2

Revisão: Catalisadores de lipase para produção de biolubrificantes bioquímicos

2.1. RESUMO

Nos últimos anos, a demanda por recursos energéticos sustentáveis tem crescido cada vez mais e, com isso, pesquisadores de todo o mundo vêm trabalhando para desenvolver tecnologias e produtos verdes. Assim, os biolubrificantes surgiram como uma alternativa promissora aos lubrificantes derivados do petróleo, pois são biodegradáveis, não tóxicos e garantem fácil descarte no meio ambiente. Para sua produção, o uso de biocatalisadores enzimáticos, principalmente da classe das lipases, oferece uma excelente alternativa, pois suas reações geralmente permitem eficiência energética mais significativa e produzem menos resíduos do que as rotas convencionais de catalisadores químicos. Portanto, com base em estudos descritos na literatura, este artigo aborda os diferentes aspectos da produção de biolubrificantes catalisados por lipases, destacando as diferentes reações e fontes de matérias-primas e apresentando alternativas para melhorar esses protocolos de processos: imobilização enzimática, álcoois e biorreatores.

Palavras-chave: Biolubrificantes. lipases. Biocatalisadores. Biorreatores.

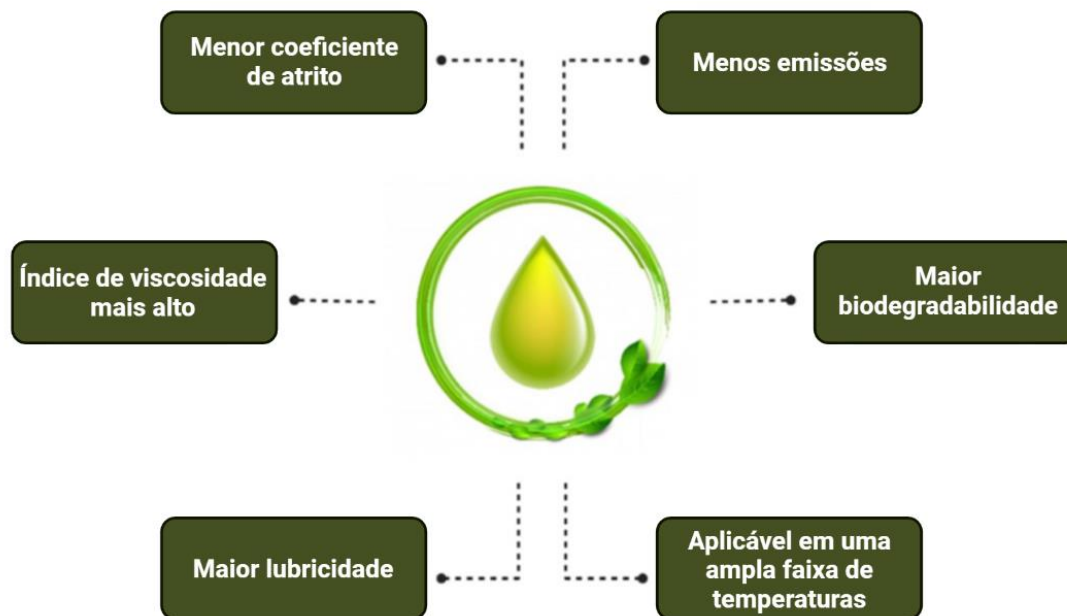
2.2. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, estudos têm sido realizados vigorosamente em todo o mundo com o objetivo final no desenvolvimento de tecnologias e produtos verdes, com a intenção primordial de conservar os recursos da terra e minimizar, tanto quanto possível, os efeitos do aquecimento global (DEHGHANI SOUFI et al., 2019; ENCINAR et al., 2020; NOGALES-DELGADO; ENCINAR; GONZÁLEZ CORTÉS, 2021; RAMOS et al., 2019; SAMIDIN; SALIH; SALIMON, 2021). No entanto, a indústria de lubrificantes consome muitos recursos fósseis. Possui aplicações abrangentes de equipamentos, máquinas e transporte para minimizar o atrito e o calor, proteger contra corrosão e desgaste, transmitir energia e eliminar contaminantes ou vedação de processos (CECILIA et al., 2020; HO; MCAULEY; PEPPEY, 2019; SALIH; SALIMON, 2021). Assim, esforços têm sido feitos para produzir bioaditivos e óleos de base biológica para formular esses lubrificantes (AFIFAH et al., 2021; DO VALLE et al., 2018; MADANKAR; DALAI; NAIK, 2013).

Biolubrificantes são ésteres de ácidos graxos derivados de óleo vegetal com propriedades lubrificantes semelhantes aos lubrificantes à base de óleo mineral (HEIKAL et al., 2017; SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2010). São considerados uma alternativa promissora aos lubrificantes derivados do petróleo, oferecendo diversas vantagens, como mostra a Figura 1, pois além de serem biodegradáveis e não tóxicos, garantem fácil descarte no meio ambiente (ATTIA et al., 2020; BASU et al., 2020; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

Lubrificantes de base biológica têm índices de viscosidade relativamente estáveis, por isso são aplicáveis em uma ampla faixa de temperaturas (GHAFAR et al., 2019; MOBARAK et al., 2014). Além disso, eles têm um alto nível de lubricidade e um coeficiente de atrito muito menor do que os lubrificantes à base de petróleo (BASHIRI et al., 2021; OWUNA et al., 2020). Qualquer produto lubrificante formulado com sucesso depende da otimização multiobjetivo dos tipos e concentrações de estoques básicos e aditivos para atender aos requisitos e especificações de aplicação (CHAN et al., 2018). O processamento de biolubrificantes à base de óleos vegetais é um processo limpo e livre de poluição, além de renovável, e cuja demanda de mercado é impulsionada por diversos fatores como consumidor, consciência ambiental, diretrizes governamentais e busca por lubrificantes (BASHIRI et al., 2021; CHAN et al., 2018; TURCO et al., 2017).

Figura 1 - Vantagens do uso de biolubrificantes.



Fonte: Autora.

A biocatálise oferece uma excelente alternativa no estabelecimento de tecnologias na produção de biolubrificantes com propriedades promissoras, como condições de reação moderadas e configurações de reatores altamente seletivas, que simplificam a integração do processo (BARBOSA et al., 2021). As reações enzimáticas geralmente aumentam a eficiência energética e produzem menos resíduos do que as rotas convencionais. Além disso, as enzimas são renováveis, não tóxicas e não perigosas (AFIFAH et al., 2021; MCNUTT; HE, 2016; UNUGUL et al., 2020). As lipases, por exemplo, têm sido utilizadas com sucesso para sintetizar biolubrificantes à base de ésteres devido à sua alta estabilidade e capacidade de converter vários tipos de substratos (AGUIEIRAS et al., 2020; BARBOSA et al., 2021; FERNANDES et al., 2021; ZHANG et al., 2020).

As lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas da família das triacilglicerol acil éster hidrolases, sendo um grupo de enzimas abundantemente presentes na natureza, responsáveis pela clivagem das ligações ésteres carboxílicos em tri-, di- e monoacilgliceróis para glicerol e ácidos graxos livres na interface água-lipídio (ALMEIDA et al., 2020; LAGE et al., 2016; SARMAH et al., 2018). Em ambientes com baixo teor de água, essas enzimas também catalisam outras reações de biotransformação,

como esterificação, interesterificação, transesterificação, acidólise e alcoólise (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; QUAYSON et al., 2020; SALIHU; ALAM, 2015).

Diante desse contexto, esta revisão visa abordar os processos de produção de biolubrificantes, especificamente catalisados por lipases, destacando suas propriedades e vantagens, além de suas perspectivas de uso futuro.

2.3. BIOLUBRIFICANTES

2.3.1. Propriedades do Biolubrificante

A maioria dos óleos usados como base para os lubrificantes consumidos em nossas atividades diárias são provenientes de petroquímicos insustentáveis, tóxicos ao meio ambiente e com baixa biodegradabilidade, dificultando o descarte após sua vida útil (ANNISA; WIDAYAT, 2018; FERREIRA et al., 2019; HOONG et al., 2019). Alternativamente, biolubrificantes e fluidos funcionais de base biológica têm muitas aplicações, desde lubrificação essencial até transmissão de energia para proteger contra corrosão e desgaste devido ao atrito, além da remoção de calor e contaminantes estranhos (GUPTA et al., 2019; REEVES et al., 2015; SAPAWE; FARHAN HANAFI; SAMION, 2019). Além disso, trazem consigo a maioria das propriedades físico-químicas necessárias para atuar como lubrificante para fluidos de perfuração (KANIA et al., 2015).

Lubrificantes produzidos a partir de óleos e gorduras naturais podem ser biodegradáveis e não tóxicos e possuem excelentes índices de lubricidade, renovabilidade e viscosidade (ARMYLISAS et al., 2019; MA et al., 2021; SABARINATH; RAJENDRAKUMAR; PRABHAKARAN NAIR, 2019; YAO et al., 2010). A viscosidade aparece como a propriedade mais importante do óleo, pois determina a resistência ao escoamento e está diretamente relacionada à temperatura, pressão e formação do filme. Quando alto, indica alta resistência ao fluxo e, se estiver baixo, implica baixa resistência ao fluxo (MOBARAK et al., 2014).

A taxa de biodegradabilidade dos óleos vegetais está na faixa de 90-98%, sendo muito superior aos lubrificantes de óleo mineral, que estão apenas entre 20-40% (PINDIT et al., 2021; RIOS et al., 2020). Essa taxa indica a capacidade de um material ser decomposto por microrganismos em até 1 ano. Portanto, lubrificantes totalmente degradáveis de óleos vegetais podem retornar à natureza (DA SILVA et al., 2020).

Eles também têm melhor lubrificação do que os lubrificantes minerais e sintéticos porque possuem grupos éster polar e ácidos graxos de cadeia longa, que aderem à superfície do metal e formam um filme lubrificante fino e eficaz para reduzir o atrito e

o desgaste por estresse, minimizando o desgaste (GUL et al., 2020; TULASHIE; KOTOKA, 2020).

Mesmo com suas inúmeras propriedades vantajosas, os biolubrificantes possuem algumas características que podem dificultar seu uso, como baixo estado de oxidação e alto ponto de fluidez (CAVALCANTI et al., 2018; REEVES et al., 2015). No entanto, para superar essas limitações, vários métodos como esterificação, transesterificação, epoxidação e modificação genética são usados para combinar as propriedades físico-químicas dos óleos vegetais e superar suas deficiências (BAHADI et al., 2019; DEGHANI SOUFI et al., 2019; XIE et al., 2020).

2.3.2. Matéria-prima dos biolubrificantes

Os biolubrificantes surgiram como uma alternativa potencial para o uso indiscriminado de produtos derivados do petróleo, que não são renováveis e extremamente poluentes (ALMASI et al., 2021; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021; NOGALES-DELGADO; ENCINAR; GONZÁLEZ CORTÉS, 2021; SINGH; SHARMA; SINGLA, 2019). Portanto, os biolubrificantes são produtos quimicamente “verdes” que utilizam matérias-primas de segunda geração, ou seja, geralmente reaproveitam óleos vegetais, animais e óleos residuais (DARMINESH et al., 2017; MASUDI; MURAZA, 2018; OWUNA et al., 2020; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). Nesse sentido, por sua imensa diversidade vegetal e alta disponibilidade de oleaginosas, o Brasil se caracteriza como um dos países com maior potencial de produção de biolubrificantes (DO VALLE et al., 2018; OLIVEIRA; MAGRINI, 2017; RIOS et al., 2020). Ressalta-se que os fabricantes de óleos essenciais vegetais assumem especial destaque como matéria-prima para novas fontes energéticas sem risco de degradação ambiental (DO VALLE et al., 2018; RIOS et al., 2020). Esses lubrificantes verdes estão ganhando extrema popularidade e aceitação justapostas por suas propriedades sustentáveis e ecológicas, como biodegradabilidade, baixa toxicidade, alta lubricidade, baixo atrito e desgaste (DARMINESH et al., 2017; HOSSAIN et al., 2018; OWUNA et al., 2020; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017).

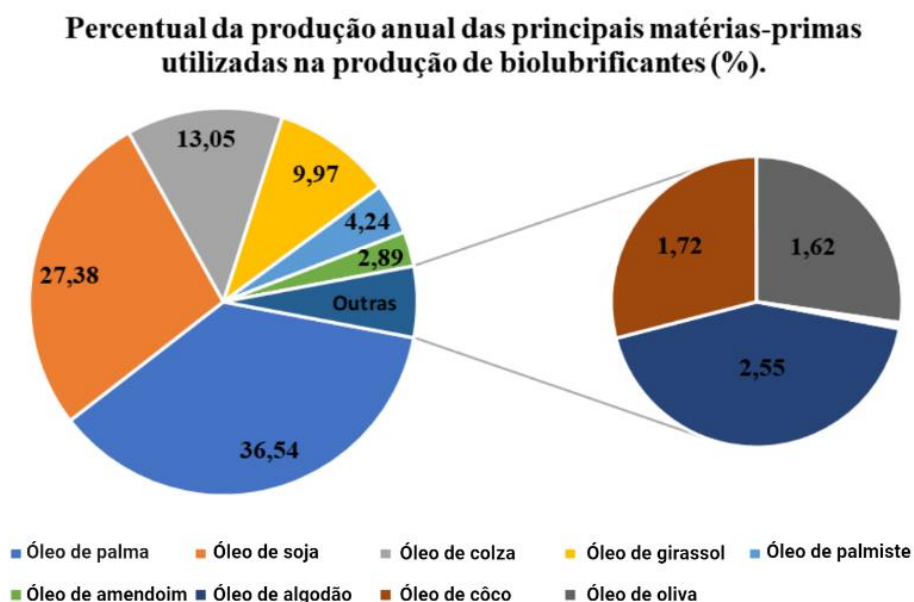
Uma ampla gama de óleos vegetais tem sido utilizada para a produção de biolubrificantes, que diferem de uma região para outra devido a fatores climáticos e geográficos, que podem favorecer ou prejudicar a síntese deste produto (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021; DARMINESH et al., 2017; MASUDI; MURAZA, 2018; RIOS et al., 2020). Mais de 350 culturas distintas de oleaginosas foram identificadas e

catalogadas como potenciais para a produção de biolubrificantes (ALMASI et al., 2021; SINGH et al., 2019). Deve-se notar que essas fontes são classificadas como óleos comestíveis e óleos não comestíveis (NOGALES-DELGADO; ENCINAR; GONZÁLEZ CORTÉS, 2021; SINGH et al., 2019). Normalmente, os seguintes óleos vegetais são usados: óleo de palma, soja, colza, azeitona, amendoim, coco, mamona, pinhão-manso, azeitona e microalgas, assim como sementes de girassol e sementes de algodão (ALMASI et al., 2021; DO VALLE et al., 2018; SINGH et al., 2019). E como óleos animais temos: óleo de peixe, várias vísceras animais (ALMASI et al., 2021; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021; NOGALES-DELGADO; ENCINAR; GONZÁLEZ CORTÉS, 2021). O Brasil se destaca por ser um dos maiores produtores de soja, algodão e mamona, além de ser um dos países com maior faixa litorânea do mundo (DO VALLE et al., 2018; OLIVEIRA; MAGRINI, 2017; RIOS et al., 2020). Ressalta-se que essas fontes proporcionam rendimentos elevados e extremamente interessantes para a indústria (DO VALLE et al., 2018; RIOS et al., 2020).

Em notoriedade, o óleo vegetal ao longo dos anos tornou-se uma fonte atrativa devido à sua estrutura química, possuindo longas cadeias de ácidos graxos e presença nas extremidades de grupos polares que tornam o óleo um composto anfifílico (ALMASI et al., 2021; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021; RIOS et al., 2020; SINGH et al., 2019). Ressalta-se que os óleos vegetais são caracterizados quimicamente como uma mistura de triglicerídeos, moléculas de glicerol com três longas cadeias de inúmeras moléculas de ácidos graxos ligadas ao grupo hidroxila (ALMASI et al., 2021; MASUDI; MURAZA, 2018; RIOS et al., 2020). Essas estruturas de triacilglicerol permitem que as moléculas se organizem, formando uma camada monomolecular fechada que aumenta a área superficial e o alto peso molecular confere pouca volatilidade e melhora as propriedades viscosas do óleo (GUIMARÃES et al., 2021b; OWUNA et al., 2020; REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017). O óleo de soja é uma das matérias-primas para produção de biolubrificantes e derivados mais relatadas na literatura devido a sua alta biodisponibilidade justificada pela facilidade de plantio das lavouras de soja (CAVALCANTI et al., 2018; DO VALLE et al., 2018; FERNANDES et al., 2021). Além disso, é um dos exemplos de óleos comestíveis, sendo este óleo utilizado domesticamente na preparação de alimentos (FERNANDES et al., 2021; PARENTE et al., 2021b; PAUL et al., 2018). Após o preparo dos alimentos, o óleo residual restante das preparações alimentícias é muitas vezes descartado em pias domésticas, prejudicando o sistema de escoamento das residências, além de poluir o ambiente externo (CAVALCANTI et al.,

2018; FERNANDES et al., 2021; PARENTE et al., 2021b; PAUL et al., 2018). A partir desse problema, os cientistas perceberam que esse óleo, até então sem utilidade, poderia ser tratado e reaproveitado como fonte para a produção de biocombustíveis e, principalmente, biolubrificantes (DA SILVA et al., 2019; MASUDI; MURAZA, 2018; PARENTE et al., 2021b; RIOS et al., 2020). Portanto, o processamento industrial desse óleo inclui a etapa de pré-tratamento para remoção de impurezas e, em seguida, inicia o refino, ou seja, a purificação desse óleo que será utilizado para a produção de biolubrificantes (DA SILVA et al., 2019; DO VALLE et al., 2018; MASUDI; MURAZA, 2018; PARENTE et al., 2021b; RIOS et al., 2020). Além disso, muitas indústrias atualmente utilizam enzimas imobilizadas (hidrolases) para catalisar o processo de produção de biolubrificantes, permitindo um processo ainda mais ecológico em comparação com outros processos inorgânicos e sintéticos (DA SILVA et al., 2019; DO VALLE et al., 2018; FERNANDES et al., 2021; PARENTE et al., 2021b). A Figura 2 mostra as principais fontes vegetais para produção de biolubrificantes e seu percentual de produção mundial em 2019/2020 (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

Figura 2 - Percentual de produção anual das matérias-primas utilizadas em biolubrificantes.



Fonte: Autora.

Fernandes *et al.* (2021) relataram a síntese de biolubrificantes através de subprodutos de soja, derivados de seu processamento, utilizando a lipase de *Candida rugosa* (CRL) em sua forma livre e imobilizada para comparar o efeito de ambos no

processo. No entanto, ambas as estratégias catalíticas obtiveram resultados semelhantes, obtendo 90% de conversão de matéria-prima em produto (FERNANDES et al., 2021). Além disso, Cavalcanti *et al.* (2018) testaram três lipases comerciais para verificar qual era a mais adequada ao processo, sendo mais seletiva e obtendo melhor desempenho. As enzimas foram CRL, lipase B de *Candida antárctica* imobilizada (CALB) e lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei*. Após todos os testes e análises, os autores concluíram que a CRL foi a enzima mais eficiente no processo catalítico para a produção de biolubrificantes (CAVALCANTI et al., 2018). A partir disso, percebe-se que a adequação da CRL ao processo de produção do biolubrificante pode ser utilizada em pelo menos 6 ciclos de reação mantendo a atividade catalítica acima de 60% (CAVALCANTI et al., 2018; FERNANDES et al., 2021).

Os óleos vegetais são uma fonte promissora para a produção de biolubrificantes (ALMASI et al., 2021; MASUDI; MURAZA, 2018). No entanto, esses óleos são muito consumidos por humanos e até mesmo usados na alimentação animal, portanto, em alguns casos específicos, o processo o torna insustentável do ponto de vista da sobrevivência (DO VALLE et al., 2018). Nesse sentido, novas fontes de óleos residuais não comestíveis são buscadas para sintetizar biolubrificantes (ALMASI et al., 2021; DO VALLE et al., 2018; MASUDI; MURAZA, 2018). O óleo de peixe tornou-se uma das principais matérias-primas devido às suas vantagens (ALMASI et al., 2021). Ressalta-se que apresenta uma das principais biodisponibilidades, pois a piscicultura cresceu nos últimos 30 anos, justificada pelos avanços tecnológicos e pelo desenvolvimento e aprimoramento de novas técnicas, sempre alertando para a preservação das espécies (DO VALLE et al., 2018). Além disso, o óleo de peixe é proveniente de resíduos de pescado, caracterizados entre as principais fontes de poluição ambiental, possibilitando assim o aproveitamento inteligente desse subproduto (ALMASI et al., 2021; DO VALLE et al., 2018).

A partir dessa ótica atual, Do Valle *et al.* (2018) relataram em seu estudo a modificação química, transesterificação, epoxidação e reação de abertura de anel em óleo de peixe, a fim de melhorar as propriedades físico-químicas. Ressalta-se que o índice de viscosidade dos ésteres derivados do óleo de tilápia mostrou-se melhor que as demais amostras de óleos minerais estudados, e a estabilidade térmica e versatilidade do biolubrificante foram melhoradas (DO VALLE et al., 2018). De Oliveira *et al.* (2021) relataram recentemente em seu estudo, que visou o uso do óleo de tilápia para produção

de biodiesel, a promissora capacidade de produção de biolubrificantes através de um processo catalisado pela lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) imobilizada, destacando o maior valor agregado do biolubrificante com biodiesel (DE OLIVEIRA et al., 2021b). Angulo et al. (2018) publicaram um estudo direto em que obtiveram um rendimento de 84% de biolubrificante a partir de óleo de peixe utilizando um sistema a vácuo e lipases para intensificar o processo, melhorando o rendimento, otimizando o sistema de reação, gerando um produto com excelente estabilidade térmica (ANGULO et al., 2018). Os óleos animais também têm sido uma importante alternativa para a produção de biolubrificantes, permitindo o uso de resíduos animais extraordinariamente poluentes e tóxicos.

As microalgas vêm ganhando espaço no cenário atual de produção de biocombustíveis e biolubrificantes (ALMASI et al., 2021; MOHAMMAD MIRZAIE et al., 2016a). Esta matéria-prima tem sido cada vez mais analisada para aplicações em larga escala. Sua produção é uma das principais desvantagens econômicas. No entanto, muitos estudos vêm desenvolvendo ferramentas e metodologias que minimizam os custos de produção (ALMASI et al., 2021; CHEAH et al., 2020; MOHAMMAD MIRZAIE et al., 2016a). Além disso, sua alta acidez pode corroer as partes mecânicas onde os lubrificantes são usados (ALMASI et al., 2021; ARAD et al., 2006). No entanto, quando modificadas quimicamente, as microalgas apresentam-se como fontes alternativas altamente abundantes devido ao alto teor de ácidos graxos de cadeia longa em sua composição (ALMASI et al., 2021; CHEAH et al., 2020; MOHAMMAD MIRZAIE et al., 2016a). Nesse sentido, o interesse por biolubrificantes biodegradáveis tem crescido muito por não apresentar danos ao meio ambiente, além de ser proveniente de fontes renováveis.

Mohammad Mirzaie *et al.* (2016) relataram um estudo que estruturou o cultivo mixotrófico de microalgas em sistemas controlados para garantir uma matéria-prima dentro dos padrões exigidos para a produção eficiente de biolubrificantes. Após todos os estudos estatísticos e desenho de experimentos, os autores geraram microalgas com teor lipídico interessante para produzir biolubrificantes biodegradáveis. Ressalta-se que o lipídio extraído apresentou alta viscosidade, alto ponto de fulgor e baixo ponto de fluidez, parâmetros essenciais para caracterizar uma matéria-prima como adequada ao processo produtivo (MOHAMMAD MIRZAIE et al., 2016b). Da Silva et al. (2020) objetivaram estudar a síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos com potencial aplicação como biolubrificantes, tendo como fonte óleo de microalgas. A lipase

imobilizada *Burkholderia cepacia* em Nb₂O₅ foi utilizada como biocatalisador e teve rendimentos de conversão entre 71 e 90%, dependendo do tamanho da cadeia alcoólica utilizada no processo. Após isso, os pesquisadores perceberam que o óleo apresentava melhor viscosidade cinemática do que o biolubrificante de outros óleos vegetais ou animais (DA SILVA et al., 2020). Chen et al. (2020), relataram a eficiência catalítica do uso de biomassa lipídica de microalgas sobre outros óleos e a adequação das propriedades analisadas como ponto de fluidez e viscosidade (CHEN; WU; ZHAO, 2020). Portanto, ambos os estudos apresentam a notoriedade do uso de microalgas para a produção de biolubrificantes (ELSHOBARY et al., 2021; HUSSAIN et al., 2021). Além disso, podem ser usadas como ferramentas de tratamento de águas residuais para as indústrias têxtil, química e cosmética (ARUN et al., 2020; CHEN; WU; ZHAO, 2020; CHU et al., 2021; DA SILVA et al., 2020; GARCÍA-GALÁN et al., 2020; HUSSAIN et al., 2021; JAISWAL et al., 2020).

Em resumo, as matérias-primas para a produção de biolubrificantes são diversas e extremamente úteis, podendo apresentar vantagens e desvantagens inerentes às suas propriedades químicas e físicas. Nesse sentido, o uso de biolubrificante definirá qual fonte será mais adequada à produção. Portanto, estudos relacionados ao desenho de métodos e planejamento de experimentos têm intensificado os estudos relacionados à área e acelerado o desenvolvimento tecnológico desse campo industrial tão focado atualmente.

2.4. ENZIMAS

As enzimas são catalisadores bioquímicos essenciais para vários processos biológicos metabólicos, como crescimento e divisão celular (RUFER, 2021). Sob diferentes condições de reação, as enzimas são atuantes principalmente na aceleração da formação de ligações químicas, diminuindo a energia necessária para o estado de transição da reação entre reagente e produto (PORTER; RUSLI; OLLIS, 2016; RUFER, 2021). As principais características de alta eficiência catalítica e alta especificidade garantem sua ampla utilização em processos industriais (TRINDADE XIMENES et al., 2021; ZHU; WU; HUA, 2019). Por outro lado, na indústria farmacêutica, no entanto, as enzimas são alvos necessários de inibidores enzimáticos, visto que a atividade enzimática desregulada causada por problemas genéticos e a ativação de enzimas necessárias à replicação de microrganismos invasores são fundamentais para o entendimento de doenças e a conseqüente produção de medicamentos (HOPKINS; GROOM, 2002; LIU et al., 2013; TRINDADE XIMENES et al., 2021).

Além disso, as enzimas também estão presentes na aplicação de biossensores, denominados biossensores baseados em enzimas. Em suma, os biossensores são dispositivos que detectam um analito biológico combinando um composto biologicamente ativo, um biorreceptor e um detector físico-químico (KURALAY, 2019; ZHU et al., 2019). Como um dispositivo de baixo custo, confiável e fácil de operar, os biossensores têm preferência em detectar diferentes analitos que antes eram monitorados por métodos analíticos tradicionais (PANDEY; MALHOTRA, 2019). Nos biossensores eletroquímicos baseados em enzimas, as enzimas (preferencialmente usadas com alguma metodologia de imobilização) atuam como um elemento de bioreconhecimento, que reage com o analito específico, gerando um sinal elétrico a ser transferido do transdutor para o sinal para o processo (CAVALCANTE et al., 2021b; RONKAINEN; HALSALL; HEINEMAN, 2010; ZHU et al., 2019). Devido à alta especificidade comum às enzimas e somada às vantagens do uso de biossensores, esse tipo de biossensor apresenta excelente potencial futuro em bioanálise (MEHROTRA, 2016; ROCCHITTA et al., 2016; ZHU et al., 2019).

Outra aplicação crítica de enzimas é a biorremediação para problemas ambientais (RATHI; KUMAR, 2021; SARAVANAN et al., 2021a). Normalmente, fungos e bactérias podem produzir enzimas capazes de degradar poluentes tóxicos, convertendo-os em substâncias não tóxicas por meio de reações catalíticas (SARAVANAN et al., 2021b, 2021c). Como vantagens, a biorremediação com enzimas é de fácil operação, baixo custo, segura e ecologicamente correta (SARAVANAN et al., 2021a). Metais pesados de processos de combustão, corantes têxteis, materiais radioativos, plásticos e pesticidas são os poluentes mais nocivos esperados no meio ambiente (SARAVANAN et al., 2021a). As reações de biodegradação mais comuns são dióxido de carbono e água (OJUEDERIE; BABALOLA, 2017). Oxidases, Lacases, Despolimerases e Peroxidases são exemplos de enzimas microbianas usadas para degradar metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), plásticos e pesticidas, respectivamente (BRIFFA; SINAGRA; BLUNDELL, 2020; DE SOUZA et al., 2020a; IHSANULLAH et al., 2020; KADRI et al., 2017; SARAVANAN et al., 2021b).

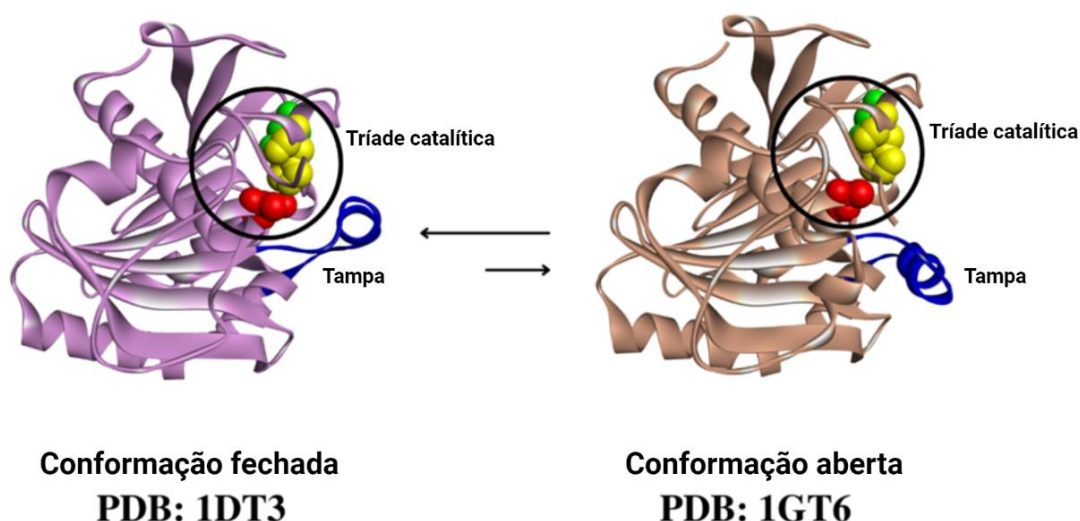
Muitas das aplicações em escala industrial de enzimas referem-se à modificação de óleos e gorduras para produzir ésteres etílicos aplicáveis nas indústrias de cosméticos, alimentos, química e combustível (ANTONIO; AMANCIO; ROSSET, 2018;

CAVALCANTE et al., 2020; LIMA et al., 2021; ROCHA et al., 2020; SIVAKANTHAN; MADHUJITH, 2020). Várias lipases são amplamente estudadas para essas aplicações e, no presente estudo, as discutiremos com mais detalhes a seguir.

2.4.1. Lipases

As lipases (triacilglicerol hidrolases 3.1.1.3) são consideradas o grupo essencial de biocatalisadores para aplicações biotecnológicas atuais, como medicamentos farmacêuticos e produção de biocombustíveis, biolubrificantes, cosméticos, e na indústria alimentícia (FONSECA et al., 2019; JAEGER; EGGERT, 2002; LIMA et al., 2017; PATEL, 2018; SAXENA et al., 1999; SUN et al., 2018). Em geral, as lipases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de lipídios, transformando-os em glicerol e ácidos graxos, além de catalisar reações de acidólise, alcoólise, interesterificação e glicerólise, dependendo da quantidade de água no meio (CAVALCANTE et al., 2020; JAEGER; EGGERT, 2002; KUMAR et al., 2021; MONTEIRO et al., 2021a). Além disso, possuem alto peso molecular, variando entre 20 e 75 kDa, com pH ideal de reação entre 6 e 8 e temperatura ideal de reação entre 30 e 40°C (OKORO; SUN; BIRCH, 2019; PADILHA et al., 2012). As lipases também são caracterizadas por alta regio-, quimio- e estereoespecificidade na presença de solventes orgânicos (KUMAR et al., 2016). A Figura 3 mostra um exemplo de uma estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus*:

Figura 3 - Estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (código PDB:1DT3; 1GT6); sítio ativo (resíduos Ser146, His258, Asp201 em preto). Todas as estruturas foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando o pymol educacional.



Quanto à origem das lipases, três classificações podem ser usadas: fontes vegetais, microbianas ou animais (LAI et al., 2018). As lipases vegetais recebem pouco interesse científico e industrial quando comparadas a outros tipos de lipases, basicamente devido às etapas problemáticas de purificação com sucessivas perdas de atividade, além do baixo número de caracterizações funcionais e da falta de estrutura cristalina já conhecida para esse tipo de lipase, exceto para a estrutura recombinante da lipase vegetal Patatina (RYDEL et al., 2003; SANKAR; PONNURAJ, 2020). Por outro lado, a lipase vegetal é razoavelmente disponível, tem alta tolerância a solventes orgânicos e tem boa especificidade de substrato, tornando-a aplicável como biocatalisador (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010; SANKAR; PONNURAJ, 2020).

Diversas lipases podem ser encontradas em animais, sendo mais estudada a lipase secretada pelo pâncreas. No corpo humano, a lipase pancreática tem a função de hidrolisar o triacilglicerol dietético em ácidos graxos livres, glicerol, monoacilglicerol e diacilglicerol (LAI et al., 2018). No entanto, a presença de inibidores naturais como polifenóis, saponinas, alcalóides e flavonóides podem diminuir a ação enzimática da lipase pancreática, influenciando os sintomas relacionados à obesidade (KUMAR; CHAUHAN, 2021; LIU et al., 2020). Além da lipase pancreática, outras lipases são responsáveis pela degradação de lipoproteínas, como a lipase hepática (LAI et al., 2018).

Por fim, as lipases de origem microbiana são as mais utilizadas em processos industriais (VERMA; MEGHWANSHI; KUMAR, 2021), com mais de 200 lipases e aproximadamente 20 tipos produzidos em escala industrial (LI et al., 2012; MEGHWANSHI et al., 2020). As lipases produzidas por microrganismos podem ser utilizadas extracelularmente, intracelularmente, líquidas, imobilizadas ou livres (ROBLES-MEDINA et al., 2009; VERMA; MEGHWANSHI; KUMAR, 2021). Além disso, o uso deste tipo de lipases apresenta múltiplas vantagens, como alta versatilidade, disponibilidade e estabilidade. Também é facilmente purificado e isolado devido à sua natureza extracelular que é secretado da célula de origem (LAI et al., 2018; VERMA; MEGHWANSHI; KUMAR, 2021). Dentre as lipases microbianas mais utilizadas em escala industrial, destacam-se as oriundas dos microrganismos *Candida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* (ROBLES-MEDINA et al., 2009).

2.4.2. Propriedades das lipases

A atividade enzimática das lipases depende do tamanho do substrato e não da sua concentração no meio reacional (LAI et al., 2018). Elas podem catalisar reações direta

e indiretamente, dependendo da atividade de água do meio de reação (LAI et al., 2018). Além disso, também possuem um mecanismo de catálise que consiste em uma cadeia polipeptídica que separa o sítio ativo da enzima do meio, podendo abrir para adsorção em superfícies hidrofóbicas, depois fechar, tornando-se estabilizada e inativa (MONTEIRO et al., 2021a; STAUCH; FISHER; CIANCI, 2015). Entre outros fatores, as lipases podem ser classificadas quanto à sua regioespecificidade e posição dos triglicerídeos (lipases específicas de sn-1,3, sn-2 ou sn-3) e a preferência em certos tipos de ácidos graxos ou tamanho da cadeia ácida a ser hidrolisada (BERGER; SCHNEIDER, 1991; GHAZALI; HAMIDAH; CHE MAN, 1995; MACRAE; HAMMOND, 1985; MONTEIRO et al., 2021a).

Vários estudos podem ser encontrados na literatura utilizando diferentes lipases para a produção de biocombustíveis. Ao contrário das reações não catalisadas para produção de biodiesel, a lipase nas reações de transesterificação promove um produto purificado em condições de reação brandas, com baixa demanda de energia (AMINI et al., 2017). Em Bueso *et al.* (2015), a lipase solúvel de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) foi utilizada em 24h de transesterificação do óleo de *Jatropha curcas* L. para a produção de biodiesel (BUESO et al., 2015). Como resultado, a transesterificação atingiu 81% de conversão em biodiesel, com 2% de volume de água no meio reacional e a 35° C (BUESO et al., 2015).

Por outro lado, muitas lipases bacterianas de *Pseudomonas* têm melhores conversões em pH alcalino ou neutro, com uma faixa de temperatura de reação ideal de 30-60 °C (RIOS et al., 2018). Em Liu et al. (2017), uma nova lipase do gene extracelular de *Pseudomonas fluorescens*, apresentou temperatura de reação ideal a 70°C e pH 8 (LIU; LI; YAN, 2017). Para produzir biodiesel com lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas, foi realizada a transesterificação de 80,5% de óleo de soja em biodiesel por 24 horas de reação sob condições ideais de temperatura e pH. Após dez ciclos, a atividade enzimática da lipase permaneceu em torno de 82%, confirmando o excelente potencial da lipase de *Pseudomonas fluorescens* em sínteses orgânicas (LIU; LI; YAN, 2017).

2.4.3. Imobilização de lipases

Ao longo dos últimos anos, a aplicação de enzimas em diferentes setores industriais é continuamente expandida (PEREIRA et al., 2018). Portanto, as enzimas funcionam como catalisadores biológicos com alta seletividade (CHAPMAN; ISMAIL;

DINU, 2018). As lipases são enzimas usadas para acelerar a reação química e otimizar o meio de reação (NARWAL; GUPTA, 2013). O uso de lipases imobilizadas reduz os fatores indesejáveis que afetam as condições do processo, como baixa estabilidade e inibição do processo pela alta concentração das substâncias, tornando o meio estável e preferencialmente insolúvel (DA SILVA; CONTESINI; CARVALHO, 2008; SUGAHARA; VARÉA, 2014; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

A imobilização da enzima ocorre pelo confinamento da lipase a uma matriz ou suporte de vários substratos e produtos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013). O suporte oferece diversas vantagens como versatilidade das diversas formas físicas disponíveis (gel e membrana), aumento da resistência a diversos fatores como pH, temperatura, pressão, alta permeabilidade, afinidade proteína-proteína e estabilidade química (WANG; HU; SHAO, 2017; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

Portanto, a imobilização proporciona fácil separação da lipase do produto, evitando a contaminação enzimática. Assim, reduzindo o custo da enzima e gerando um meio insolúvel para melhor fixação ao suporte (HOMAEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015). Dessa forma, podemos destacar que os principais componentes para imobilização enzimática dependem da enzima, da matriz e do modo de ligação e interação (MOHAMAD et al., 2015). As interações podem ocorrer através de ligações covalentes, iônicas, de afinidade e adsorção física reversível (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013). Para isso, podemos destacar os principais fatores que influenciam a imobilização enzimática, incluindo métodos de imobilização para atividade catalítica e estabilidade de lipases (REIS et al., 2019a).

2.4.4. Fatores de influência na imobilização enzimática

Ao destacar a escolha da técnica de imobilização enzimática, podemos entender que a enzima, após a imobilização, pode alterar propriedades físicas e químicas (MOHAMAD et al., 2015). A influência do suporte e dos produtos produzidos pode alterar a estabilidade e as propriedades cinéticas durante a reação (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007). A lipase imobilizada desempenha o papel de manter sua conformação estrutural terciária pela formação de complexos ou por ligações covalentes ou ligações de hidrogênio com suporte, maximizando a estabilidade e reatividade em seu estado imobilizado (MOHAMAD et al., 2015; SECUNDO, 2013).

Considerando o processo de imobilização da enzima, a solução para melhor aproveitamento da reação catalítica se resume à distinção da técnica de fixação entre os grupos amino reativos na superfície da matriz e o sítio ativo da enzima (REIS et al.,

2019a). Assim, os principais fatores diretamente ligados ao desenvolvimento de enzimas imobilizadas são o processo de seleção dos suportes, condições de operação e métodos de imobilização (GUZIK; HUPERT-KOCUREK; WOJCIESZYNSKA, 2014; HOMAIEI et al., 2013).

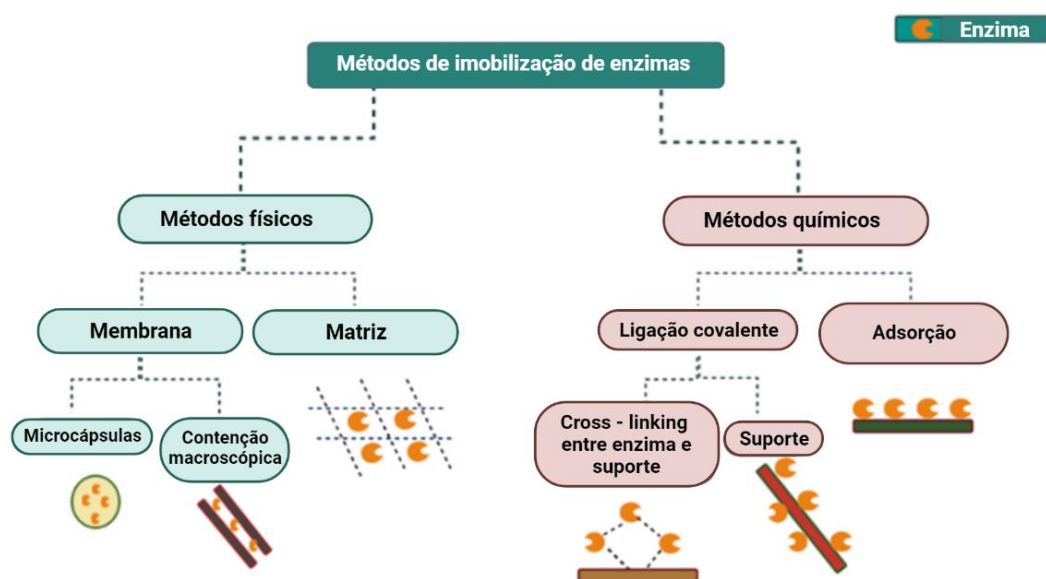
A seleção do suporte ideal determina sua eficácia no processo de imobilização enzimática, onde as propriedades do material utilizado irão estabelecer o meio de preparação enzimática (MOHAMAD et al., 2015). Assim, as interações acontecem de acordo com as propriedades químicas, mecânicas e cinéticas descritas pelas vantagens excelentes do suporte: biocompatibilidade, resistência à compressão, hidrofiliçidade, alta afinidade, estabilidade mecânica, viabilidade de regeneração, material biodegradável de baixo custo e entre outros (JOYCE et al., 2021; MOHAMAD et al., 2015). No entanto, suportes feitos de materiais comuns como sílica, resinas, polímeros sintéticos, entre outros, enfrentam o alto custo desses materiais e tecnologia aplicada para fixar os aumentos de suporte usando lipases (SUGAHARA; VARÉA, 2014). Além disso, os suportes porosos são mais utilizados para imobilização devido à sua alta área superficial, que proporciona maior carga enzimática, além de serem ecologicamente sustentáveis (HOMAIEI et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015).

As lipases apresentam maior estabilidade em condições operacionais, pH, calor, solvente orgânico e temperatura. No entanto, as vantagens de seu uso podem ser reduzidas devido ao alto custo de produção e purificação. No entanto, essas desvantagens podem ser resolvidas com os métodos de imobilização enzimática (SUGAHARA; VARÉA, 2014). Além disso, as lipases imobilizadas em suportes sólidos permitem a recuperação da enzima, otimizando assim os custos operacionais dos processos industriais (BUSSAMARA et al., 2012; MOHAMAD et al., 2015).

2.5. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Várias técnicas podem ser usadas para imobilização de enzimas, desde adsorção física reversível até ligações iônicas ou covalentes estáveis. Esses métodos são classificados de acordo com as categorias de irreversíveis e reversíveis (MOHAMAD et al., 2015). Além disso, os métodos destacados para este estudo são aprisionamento, adsorção física, ligação covalente e reticulação, classificados de acordo com a reação química e o suporte utilizado para todo o processo de imobilização das lipases (LIU; CHEN; SHI, 2018; MOHAMAD et al., 2015; RAFIEE; REZAAE, 2021).

Figura 4 - Métodos tecnológicos de imobilização de enzimas.



Fonte: Autora.

2.5.1. Encapsulamento

As enzimas são consideradas frágeis e sofrem influência de agentes externos na estrutura, e o melhor método de proteção é o encapsulamento, como no caso das proteases (NASSEAU et al., 2001). A encapsulação evita a agressão e a desnaturação das proteínas no estado funcional sol-gel através do método químico (PIERRE, 2004). Além disso, ocorre através de ligações covalentes ou não covalentes em géis ou fibras (HOMAEI et al., 2013). As principais vantagens do uso desta técnica são as características do suporte que proporcionam uniformidade, biocompatibilidade, estabilidade, condições suaves e alta pureza (CALIFANO; COSTANTINI, 2020).

O estado sol-gel é um vidro processado quimicamente inerte, mantendo um padrão quebradiço aplicado para imobilizar enzimas e biossensores (ASSIS, 2003; HOMAEI et al., 2013). Logo, eles mantêm uma estrutura porosa para difundir o substrato para a enzima. Assim, a síntese sol-gel fornece um meio macio para proteínas (BHATIA et al., 2000; LIVAGE; CORADIN, 2018). As cápsulas produzidas têm diâmetro entre 1nm e 1.000nm chamadas nanocápsulas e cápsulas com tamanhos de 1-1.000 µm e acima de 1mm, conhecidas como microcápsulas (TROJANOWSKA et al., 2017). Os processos de encapsulamento com suportes nanoestruturados revolucionaram o mercado de imobilização devido às suas diversas aplicações industriais, como a indústria de química

fina, biocombustíveis e o desenvolvimento de biossensores (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; HOMA EI et al., 2013).

2.5.2. Adsorção física

O processo de imobilização por adsorção é utilizado para imobilizar enzimas ligadas aos suportes por meio de interações fracas, como forças de van der Waals e interações hidrofóbicas (MOHAMAD et al., 2015). Resultados com lipases imobilizadas mostraram alta estabilização e atividade satisfatória, por exemplo, esponja de carbonato de ciclodextrina sintetizada (CD-NS-1:4) por adsorção de lipase de *Pseudomonas fluorescens* (BOSCOLO; TROTTA; GHIBAUDI, 2010; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

Esta técnica é considerada mais direta e aplicada em condições suaves (REIS et al., 2019a). Portanto, este método apresenta desvantagens para seu uso, como baixa estabilidade operacional, interações fracas entre enzima e suporte, e também a quantidade máxima de enzima absorvida durante a reação (MOHAMAD et al., 2015). Para melhorar esta técnica, as cargas de superfície da proteína e do suporte precisam ser opostas para obter interações fortes (COSKUN, 2016; OZBOYACI et al., 2016; ZHOU; PANG, 2018).

O suporte oposto determina que a carga não pode ultrapassar as repulsões eletrostáticas entre as enzimas, e o suporte adequado regula o pH de adsorção (MOHAMAD et al., 2015). É essencial obter condições suaves para preservar a estrutura da enzima e permanecer inalterada (CALIFANO; COSTANTINI, 2020). Aplicações de macromoléculas sintéticas com imobilização por adsorção são utilizadas em atividades médicas e alimentícias (EL-HAMSHARY; AL-SIGENY; ALI, 2006; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

2.5.3. Ligação covalente

A imobilização das enzimas por ligação covalente ao suporte ocorre devido a sua cadeia lateral de aminoácidos (arginina, histidina) e nível de reatividade fundado em vários grupos funcionais (imidazol, indolil, hidroxila fenólica) (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; MOHAMAD et al., 2015). O uso de suporte insolúvel traz a vantagem da ligação irreversível à matriz como estabilidade da enzima e diminui o processo de lixiviação (HOMA EI et al., 2013). Assim, superfícies modificadas com peptídeos durante a ligação covalente obtêm atividade e estabilidade durante a reação (FU; REINHOLD; WOODBURY, 2011; PEREIRA et al., 2018).

A utilização de diversos suportes como sílica, mesoporosa, quitosana é responsável por aumentar a meia-vida e estabilidade da enzima acoplada a ligações covalentes (REIS et al., 2019a). A sílica é considerada um excelente material para imobilização de enzimas por meio de ligação covalente por grupos silanol definidos, possibilitando o controle da posição e densidade da enzima (HOMAEI et al., 2013; SANTANA et al., 2018). A aplicação de hidrato de silicato de magnésio com junção álcool desidrogenase em nanofibras é uma opção para esta técnica devido à resistência térmica (ONG et al., 2010; XUE et al., 2019).

Para adquirir a adesão, é necessário o uso de um agente de reticulação, como glutaraldeído e derivados de carbodiimida, para manter a estrutura conformacional e funcional das enzimas (REIS et al., 2019a). O glutaraldeído é conhecido como um reticulante bifuncional por ser solúvel em solventes aquosos e produzir ligações covalentes estáveis (MIGNEAULT et al., 2004). O desempenho da enzima imobilizada depende das características do material de suporte utilizado, como suportes porosos com alta capacidade de carga enzimática, resultando em maior atividade catalítica (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; MOHAMAD et al., 2015; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

2.5.4. Cross-linking

A técnica de reticulação produz ligações covalentes entre a enzima e os grupos ativos por meio de reagentes bi ou multifuncionais, também conhecido como copolimerização (HOMAEI et al., 2013). Os reagentes mais conhecidos são glutaraldeído, glioxal, diisocianatos, hexametileno, tolueno diisocianato, entre outros (ADLERCREUTZ, 2013; POLLARIS et al., 2016). Este método é considerado barato e simples, mas não é utilizado em enzimas puras, pois, com a aplicação de reagentes disponíveis, a reticulação pode desnaturar ou modificar a estrutura da enzima, levando à perda da atividade catalítica (ADLERCREUTZ, 2013; BASHIR; SOOD; BANDRAL, 2020).

O reagente mais aplicado nesta técnica é o glutaraldeído, considerado econômico e acessível em grandes quantidades (SATAR et al., 2017). Além disso, seu uso tem sido para auxiliar na imobilização de enzimas por meio de cross-linking através do grupo amino livre, mesmo sendo pH-dependente (MOHAMAD et al., 2015). Vale ressaltar que a formação de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) em precipitantes como acetona, sulfato de amônio e etanol têm sido empregados pela adição de um

precipitante a uma solução da proteína, com a reticulação dos agregados servindo para aumentar a estabilidade da enzima (REIS et al., 2019a; XU et al., 2018).

Já os suportes de diâmetro nano, apresentam uma mudança efetiva na área de imobilização da enzima (REIS et al., 2019a). A reticulação de enzimas a nanofibras apresenta uma excelente atividade residual, que promoverá um aumento da área superficial e da porosidade (JACKSON; CORREA; BETANCOR, 2019; ROY; ABRAHAM, 2004). Assim, as aplicações de nanofibras isoenzimáticas imobilizadas por CLEAs da rota de quitosana eletrofiada (CS) têm eficácia em aplicações antibacterianas (MOHAMAD et al., 2015; PARK et al., 2013).

2.6. ÁLCOOL NA PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES CATALISADOS POR LIPASE

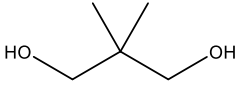
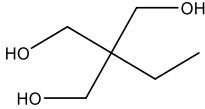
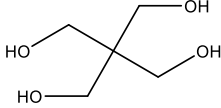
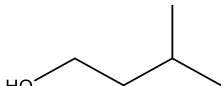
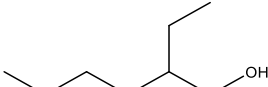
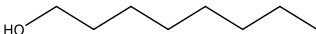
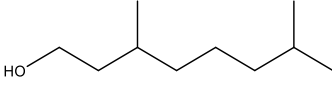
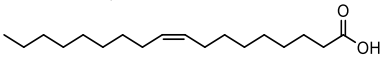
Para empregar óleos naturais como biolubrificantes, é necessário melhorar suas propriedades físico-químicas (ISAH et al., 2021; OWUNA et al., 2020; SALIMON et al., 2014; SINGH; SHARMA; SINGLA, 2019). Para tanto, a síntese de ésteres envolvendo modificação por microrganismos, álcoois, poliálcoois, poliglicóis, éteres perfluoroalquílicos, entre outros, pode melhorar os óleos naturais e torná-los lubrificantes com propriedades superiores aos óleos minerais (MCNUTT; HE, 2016; OWUNA et al., 2020). Sua viscosidade pode ser melhorada aumentando o comprimento da cadeia do álcool, ramificando as moléculas, incluindo grupos cíclicos no esqueleto molecular (DO VALLE et al., 2018; ENCINAR; NOGALES; GONZÁLEZ, 2020; KANIA et al., 2015).

As propriedades térmicas dos óleos naturais também podem ser melhoradas pela reação com álcoois com cadeias alquílicas mais longas ou ramificadas, como 2-etilhexanol, neopentilglicol (NPG), pentaeritritol (PE), trimetilolpropano (TMP), trimetilolhexano (TMH) e trimetiloletano (TME) (CECILIA et al., 2020; KUZMINSKA; BACKOV; GAIGNEAUX, 2015; SABOYA et al., 2017).

O ponto de fluidez e a estabilidade termo-oxidativa são as propriedades mais sensíveis do biolubrificante de óleos vegetais devido aos ácidos graxos insaturados que impedem sua aplicação direta como biolubrificantes ou fluidos industriais (OWUNA et al., 2020; SALIMON et al., 2014; SHARMA; CHANDRA; SACHAN, 2019; SINGH; SHARMA; SINGLA, 2019). Trimetilolpropano é o álcool mais utilizado na literatura para síntese de biolubrificantes (CAVALCANTI et al., 2018). Ser um triol diminui o ponto de fluidez do biolubrificante, embora também provoque uma queda na estabilidade termo-oxidativa do álcool (CECILIA et al., 2020; OWUNA et al., 2020). Os

neopentilpolióis são álcoois ramificados maiores, com baixo ponto de fluidez e maior estabilidade oxidativa (CECILIA et al., 2020; GRYGLEWICZ; MUSZYŃSKI; NOWICKI, 2013; SALIMON et al., 2014). Dentre eles, o neopentilglicol é outro álcool bastante citado na literatura para biolubrificantes (AGUIEIRAS et al., 2020; RAJAENDRAN et al., 2015). A Tabela 1 mostra os álcoois de cadeia longa utilizados na literatura recente para produção de biolubrificantes utilizando lipases.

Tabela 1 - Álcoois de cadeia longa para produção de biolubrificantes usando lipases.

Nome e estrutura	Principais usos comerciais	Lipase fonte	Referência
 Neopentilglicol	Síntese de poliésteres, tintas, lubrificantes e plastificantes	Novozym® 435	(AGUIEIRAS et al., 2020)
 Trimetilpropano	Bloco de construção na indústria de polímeros	<i>Candida rugosa</i>	(FERNANDES et al., 2018)
 Pentarritrol	Building block for the synthesis and production of explosives, plastics, cosmetics, etc.	<i>Candida rugosa</i>	(CAVALCANTI et al., 2018)
 Álcool isoamílico	Bloco de construção para a síntese e produção de explosivos, plásticos, cosméticos, etc.	<i>Aspergillus oryzae</i>	(GUIMARÃES et al., 2021a)
 2- Etilhexanol	Produção de emolientes, plastificantes, solventes, sabores e fragrâncias	<i>Candida Antarctica</i>	(SERPA et al., 2021)
 Octanol	Matéria prima para tensoativos, cosméticos, plastificantes. Base de óleo para lubrificantes e emulsificantes	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(BASSI et al., 2016)
 3,7 Dimetil 1-Octanol	Aromatizante ou adjuvante	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(TRIVEDI et al., 2015)
 álcool olefílico	Amaciamento e lubrificação de tecidos têxteis e produção de papéis e tintas	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	(TRIVEDI et al., 2015)

Fonte: Autora.

Gryglewicz et al. (2013), estudaram como o tipo de álcool utilizado afeta as propriedades físicas do biolubrificante produzido pela transesterificação dos ésteres metílicos do óleo de colza usando diferentes catalisadores enzimáticos. Utilizando 2-etilhexanol (2-EP), neopentilglicol (NPG) e trimetilolpropano (TMP), observou-se que o 2-EP levou a um produto éster com melhor ponto de fluidez e melhor estabilidade termo-oxidativa em relação aos produtos resultantes da aplicação de NPG e TMP. Observou-se também que os ésteres de 2-EP também exigiram menor tempo de reação de transesterificação (GRYGLEWICZ; MUSZYŃSKI; NOWICKI, 2013).

Vale ressaltar que os sistemas biocatalisados para produção de biolubrificantes apresentarão diferentes desempenhos e produtos para uma ampla gama de aplicações em motores (FERNANDES et al., 2018; GRYGLEWICZ; MUSZYŃSKI; NOWICKI, 2013; GUIMARÃES et al., 2021a; TRIVEDI et al., 2015). As lipases têm especificidade diferente e seus carreadores mostrarão diferentes interações com cada tipo de álcool (FERNANDES et al., 2018; TRIVEDI et al., 2015). Outros parâmetros como tempo de reação, temperatura, presença de solventes, composição química do óleo irão afetar diretamente e, portanto, devem ser determinantes para a escolha do álcool para biolubrificantes (FERNANDES et al., 2018; GRYGLEWICZ; MUSZYŃSKI; NOWICKI, 2013; GUIMARÃES et al., 2021a; TRIVEDI et al., 2015).

2.7. PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES COM LIPASE

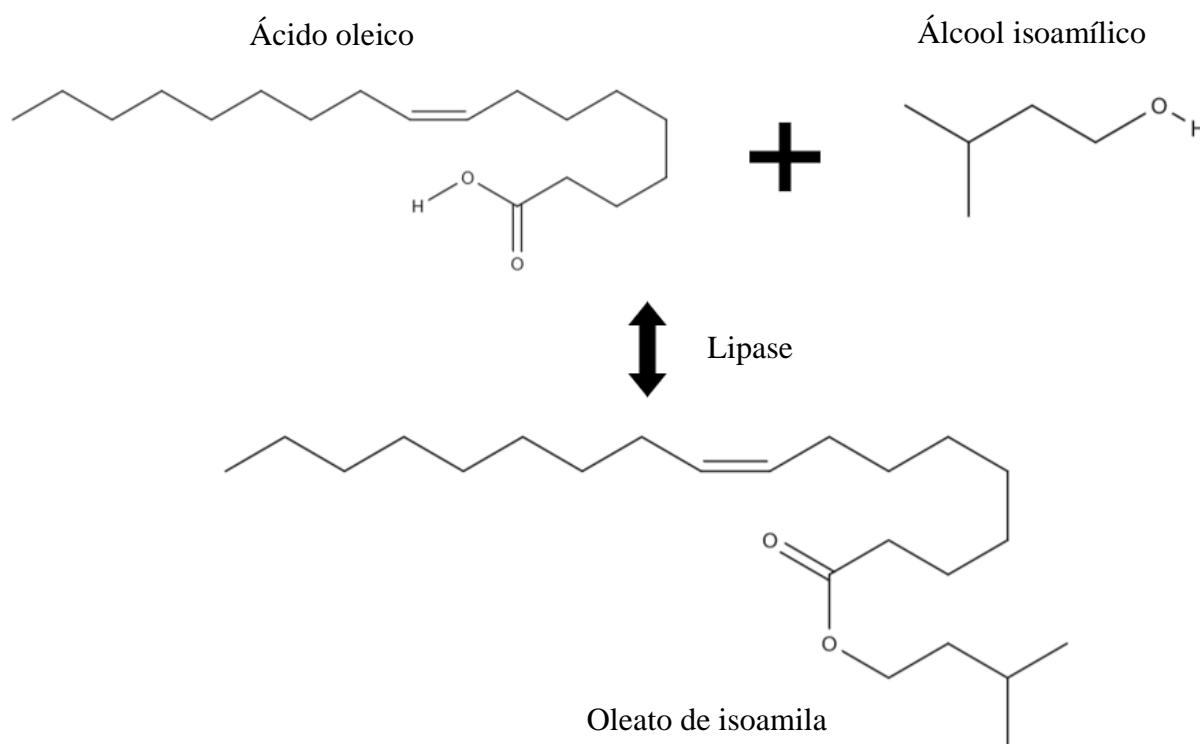
2.7.1. Processo de esterificação

Conforme demonstrado na literatura, a síntese de biolubrificantes, auxiliada por catálise enzimática, pode ser por meio de diferentes mecanismos: esterificação, transesterificação e hidroesterificação (CHOWDHURY; MITRA; BISWAS, 2013; DA SILVA et al., 2020, 2015; GRECO-DUARTE et al., 2019). O primeiro usa ácidos graxos livres (AGL) e álcool particular para produzir os ésteres desejados. Portanto, a esterificação de AGL resulta em uma melhora nas propriedades físicas e químicas em comparação com as propriedades dos óleos base AGL (SARNO; IULIANO; CIRILLO, 2019).

Considerando a esterificação como um processo de fácil reprodução e com resultados promissores, Lage *et al.* (2016) estudaram o desenvolvimento de um biocatalisador imobilizado via adsorção física e sua aplicação na síntese de

biolubrificantes por esterificação em meio isento de solventes (ver Figura 5). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada em suporte mesoporoso e utilizada como catalisador para a reação entre ácido oleico e álcool isoamílico. Uma conversão máxima de 85% foi alcançada no estudo após 30 minutos de reação. Além disso, os parâmetros termodinâmicos da reação foram determinados, mostrando que a esterificação, em condições experimentais ótimas, foi realizada de forma termodinamicamente favorável. Além disso, o biocatalisador preparado apresentou notável estabilidade operacional, mantendo sua atividade inicial por 30 ciclos de reação (LAGE et al., 2016).

Figura 5 - Reação de síntese de biolubrificantes por esterificação



Fonte: (LAGE et al., 2016).

A fim de determinar o melhor derivado para a produção de biolubrificante por esterificação utilizando ácido oleico e n-octanol como reagentes, Bassi *et al.* (2016) analisaram lipases de pâncreas suíno (PPL), *Mucor javanicus* (MJL), *Candida sp.* (CALA), *Rhizomucor miehei* (RML) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL) imobilizados em partículas de polimetacrilato (PMA) como biocatalisadores. Entre as enzimas estudadas no processo, TLL-PMA foi o derivado que apresentou os melhores valores de conversão (95,1%) após 60 minutos de reação a 45°C, 10% m/V da enzima imobilizada

e uma razão molar de 1 :1,5 (ácido oleico:n-octanol) no meio isento de solvente; e que teve a melhor estabilidade operacional, mantendo sua atividade inicial mesmo após doze ciclos de reação (BASSI et al., 2016).

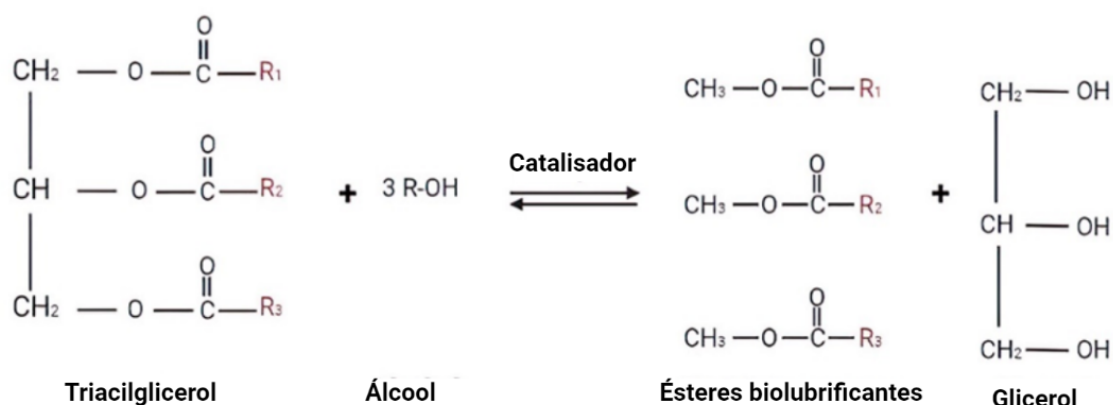
Mais recentemente, Fernandes *et al.* (2020) utilizaram subprodutos do processamento de óleo de soja com álcoois de neopentilglicol (NPG) e trimetilolpropano (TMP) para produzir biolubrificantes via esterificação utilizando as formas livre e imobilizada de lipase de *Candida rugosa* (CRL). Aproximadamente 80% das conversões foram alcançadas usando CRL livre após 30 minutos usando NPG e 180 minutos usando TMP. No entanto, conversões notáveis de 90% foram alcançadas somente após 6 horas de reação usando a proteína imobilizada. Mostrando que a esterificação de derivados do processamento de óleo de soja pode ser aplicada na produção de ésteres lubrificantes utilizando diferentes álcoois e formas livres e imobilizadas de biocatalisadores (FERNANDES et al., 2021).

Nesse sentido, fica evidente que a esterificação de ácidos graxos livres pode ser aplicada em diferentes arquiteturas de processos e reações, principalmente em bioprocessos, sendo condicionada apenas aos substratos, parâmetros de reação e tipo de enzima escolhida (livre ou imobilizada) (BASSI et al., 2016; CHOWDHURY; MITRA; BISWAS, 2013; DA SILVA et al., 2020, 2015; FERNANDES et al., 2018, 2021; GRECO-DUARTE et al., 2017, 2019; LAGE et al., 2016; MIGUEZ et al., 2018; PAPADAKI et al., 2018; SARNO; IULIANO; CIRILLO, 2019).

2.7.2. Processo de transesterificação

Apesar de existirem diversas rotas para obtenção de biolubrificantes, as reações de esterificação e transesterificação são os mecanismos mais relatados na literatura (CECILIA et al., 2020; CERÓN et al., 2018; PANCHAL et al., 2017). A reação de transesterificação consiste na transformação de um éster em um novo éster através da troca do grupo alquila, conforme mostra a Figura 6. Assim, na formação do biolubrificante, ocorre a reação entre 1 mol de triacilglicerol com três mols de cadeia alcoólica. Ao final do processo, uma mistura de ésteres monoalquílicos de ácidos graxos e glicerol se forma como subproduto (CERÓN et al., 2018; PANCHAL et al., 2017).

Figura 6 - Representação esquemática do processo de transesterificação.



Fonte: Autora.

A reação pode ocorrer em condições de alta temperatura e pressão, sem a presença de catalisadores, ou de forma mais branda usando catalisadores homogêneos ou heterogêneos (ácidos ou básicos) (FAROBIE; MATSUMURA, 2017; PANCHAL et al., 2017). A transesterificação homogênea apresenta desvantagens como dificuldade de recuperação do catalisador, produção em larga escala de água residual e necessidade de utilização de materiais precursores de alta qualidade, tornando o processo mais caro (AMIRIL et al., 2018; GHAFAR et al., 2019).

Assim, catalisadores heterogêneos mostram-se mais atrativos industrialmente, pois são mais fáceis de recuperar, além de apresentarem menor degradação ambiental (GUPTA; AGARWAL; DALAI, 2020). A aplicação de lipases imobilizadas como catalisadores heterogêneos é amplamente relatada na literatura para que as enzimas tenham alta atividade e especificidade (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019). Vale ressaltar que a transesterificação por via enzimática reduz a formação de componentes de coloração escura. Esses componentes são formados quando catalisadores ácidos são usados (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019).

Fatores como razão molar óleo/álcool, temperatura de reação, além do tipo e concentração de catalisador e matéria-prima, influenciam diretamente não só nas características físico-químicas do biolubrificante, mas também na sua conversão (PANCHAL et al., 2017). Cerón *et al.* (2018) estudaram a transesterificação do óleo de palma com álcool isoamílico. Os autores utilizaram a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em matriz epóxi sílica-hidroxietilcelulose como biocatalisador. Os pesquisadores estudaram a influência da razão molar óleo/álcool e obtiveram uma conversão de 98% mantendo a razão de 1:4 após 8 horas de reação (CERÓN et al., 2018).

Silva *et al.* (2020) propuseram uma metodologia que causaria menos impacto ao meio ambiente. Para isso, os pesquisadores estudaram a transesterificação do óleo de microalgas com óleos fúsel. Os autores utilizaram como catalisador a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada em Nb₂O₅. Após 120 horas de reação mantendo a razão molar óleo/álcool de 1:8, à temperatura de 45°C, e agitação a 150 rpm. Uma taxa de conversão variando de 70,8 a 89% foi obtida (DA SILVA *et al.*, 2020).

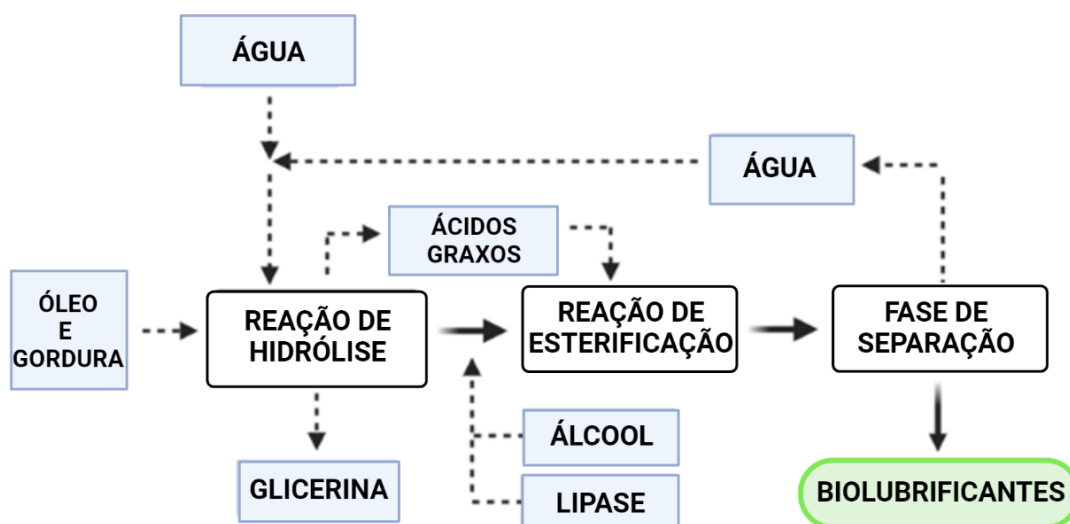
Assim, como mencionado acima, as reações de transesterificação são amplamente estudadas. No entanto, a maioria dos trabalhos envolvendo reações catalisadas por enzimas está relacionada à transesterificação para produção de biodiesel. Portanto, há necessidade de mais estudos voltados ao uso de biocatalisadores na produção de biolubrificantes, pois o uso desses materiais se mostra promissor (GUPTA; AGARWAL; DALAI, 2020; PANCHAL *et al.*, 2017).

2.7.3. Processo de hidroesterificação

São realizadas otimizações no processo de produção do biolubrificante para melhorar as características físico-químicas deste produto e assim aumentar sua aplicação no mercado (FARAG *et al.*, 2018; GRECO-DUARTE *et al.*, 2017). Assim, o biolubrificante que já é produzido a partir das reações de transesterificação e esterificação ainda pode ser produzido pela reação de hidroesterificação (BEZERRA *et al.*, 2020a; MA *et al.*, 2021). Esta nova rota produzirá melhores propriedades e é altamente biodegradável em diferentes condições (PARENTE *et al.*, 2021a; PINDIT *et al.*, 2021).

A reação de hidroesterificação consiste em três etapas, sendo que a etapa de hidrólise é seguida pela etapa de esterificação e termina com a etapa de separação de fases, conforme mostrado na Figura 7 (AGUIEIRAS *et al.*, 2014). Na hidroesterificação, a matéria-prima pode ser gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino de óleo vegetal, não sendo relevantes os índices de acidez e umidade dessas amostras relevantes (FERREIRA DE MELLO *et al.*, 2017). Devido a essa característica, essa reação difere da reação de transesterificação, pois não produz sabões que reduzam os rendimentos do processo nem impedem uma separação adequada entre o biolubrificante e a glicerina (WANCURA *et al.*, 2021).

Figura 7 - Reação de hidroesterificação.



Fonte: Autora.

Em relação à etapa de hidrólise, é possível definir que essa reação ocorre em óleos ou gorduras e água, tendo como subproduto a glicerina e os ácidos graxos (BOULANGER et al., 2015). Os subprodutos da hidrólise sempre apresentam acidez acima de 99%, mesmo que os índices de acidez e umidade da matéria-prima não sejam tão altos. Vale ressaltar que este é o objetivo da hidrólise (CHEN et al., 2020). Este processo permite obter glicerina com uma pureza melhor do que a glicerina obtida por transesterificação (COSTA et al., 2020).

Em seguida ocorre a separação dos subprodutos, glicerina e ácidos graxos (AGUIEIRAS et al., 2014). Assim, os ácidos graxos são utilizados na próxima etapa, correspondente à esterificação. A reação de esterificação ocorre entre os ácidos e o álcool para neutralizar esses ácidos (DOS SANTOS et al., 2017). Portanto, devido à pureza dos ácidos possibilitada pela hidrólise, o biolubrificante produzido terá um excelente grau de pureza, fazendo com que etapas adicionais de lavagem que reduzem custos e danos à natureza, que poderiam ocorrer com o descarte de lavagens, sejam dispensadas (BOULANGER et al., 2015; GAIDE et al., 2016). Por fim, a reação de esterificação também produz água, que será reutilizada no processo de hidrólise, completando assim a hidroesterificação (WANCURA et al., 2021).

A hidroesterificação apresenta inúmeras vantagens, como a possibilidade de utilização de lodo neutralizante, que é subproduto de outros processos (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Esta reação é mais rápida, reduzindo assim a energia de ativação utilizada na reação. A água é o único subproduto da etapa de esterificação e,

por sua vez, é reutilizada no início da reação de hidroesterificação (MOWLA; KENNEDY; STOCKENHUBER, 2018). Embora seja necessário um alto investimento para iniciar a operação de uma estrutura para essa reação, a operação é duas vezes mais barata que uma reação de transesterificação, o que facilita a recuperação do capital empregado, e esse processo não deixa resíduos, sejam líquidos ou sólidos (FONSECA et al., 2018; GAIDE et al., 2016).

Por outro lado, a reação de hidroesterificação também apresenta algumas desvantagens, sendo a primeira o custo inicial muito superior ao valor de uma reação de transesterificação (FERREIRA DE MELLO et al., 2017). O uso de lipases como catalisadores resulta em bons valores de rendimento. No entanto, essas lipases tendem a ser mais caras, exigindo que o monitoramento do pH seja realizado em períodos mais curtos e aumentando o tempo de reação (FONSECA et al., 2018). Assim, pesquisas são realizadas para otimizar ainda mais essa reação para compensar as desvantagens desse processo (FOLSTER et al., 2021).

2.8. PROJETOS DE BIORREATOR PARA PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE DE LIPASE

O planejamento e configuração de biorreatores utilizados na catálise enzimática de biolubrificantes essenciais para a escala industrial assistida em laboratório. Conseqüentemente, os fatores essenciais que maximizam o bioproduto e a viabilidade econômica devem ser lembrados. Fatores como: natureza da matéria-prima, funcionamento do reator (modo descontínuo ou contínuo), transferência de massa e possíveis inibições enzimáticas. Na literatura é possível encontrar a descrição de reatores de tanque agitado, colunas de leito fixo e colunas de leito fluidizado (modo descontínuo ou contínuo).

Os biorreatores de tanque agitado são os sistemas mais comuns usados nos processos de produção de biotecnologia. Vários fabricantes fornecem sistemas descartáveis e reutilizáveis. O tipo, tamanho e vários impulsores usados em sistemas energizados reduzem as características e projetos dos biorreatores (SCHIRMER et al., 2021). Portanto, esses sistemas com seus distintos agitadores estão sendo cada vez mais utilizados para promover principalmente a mistura de fluidos e, conseqüentemente, sua homogeneidade, afetando a qualidade, inovação e renovação natural do bioproduto

discutido, pois acelera a transferência de massa e calor entre os átomos (WITTMANN et al., 2017).

Os biorreatores de tanque agitado são operados de maneira descontínua e consistem em um recipiente no qual as misturas de reagentes são agitadas mecanicamente. O STR é fácil de operar e a agitação eficiente resulta na ausência de gradientes significativos de temperatura e concentração de substrato (HAMA; KONDO, 2013). O STR operado em modo de lote tem um baixo rendimento devido à necessidade de descarregar, limpar e recarregar o reator antes de iniciar um novo lote. A desvantagem de baixa produtividade do STR em lote pode ser reduzida usando um STR contínuo onde a enzima é retida no reator utilizando tecnologias de membrana colocadas na saída do reator, sendo possíveis várias configurações (POPPE et al., 2015).

Os reatores de fluxo contínuo são mais atraentes do ponto de vista industrial, pois podem funcionar por longos períodos de operação interrompida em grande escala. Os parâmetros para sua operação são mais facilmente configurados; portanto, a qualidade do produto é mais estável quando comparada aos reatores de modo descontínuo (GUPTA; AGARWAL; DALAI, 2020). As duas configurações de reatores de fluxo contínuo mais utilizadas na indústria oleoquímica são reatores de leito fixo (PBR) e reatores de leito fluidizado (FBR) utilizados em sistemas catalíticos de grande escala devido à sua alta eficiência e facilidade de construção e operação (POPPE et al., 2015). O PBR requer uma quantidade mínima de equipamentos auxiliares e é muito eficiente, pois há uma alta área de superfície para que a reação ocorra por unidade de volume e tem sido usado para a biotransformação de óleos e gorduras catalisada por lipases imobilizadas (POPPE et al., 2015). O PBR é cineticamente mais favorável que o STR, pois não tem a desvantagem de altas tensões de cisalhamento da agitação mecânica (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

No entanto, em comparação com o PBR, o FBR exibe perda de carga reduzida no reator, fluxo mais constante, excelente estabilidade de temperatura, maior transferência de massa e taxas de reação e formação de canal menos preferencial (POPPE et al., 2015). Embora reatores de fluxo contínuo sejam usados na indústria oleoquímica, eles ainda são raramente usados para síntese de biolubrificantes (CERÓN et al., 2018; DA SILVA et al., 2020; HAJAR; VAHABZADEH, 2016).

O processo de produção de reatores em batelada é considerado flexível e direto, e o tamanho do biorreator pode variar (pequeno ou grande), com a vantagem de

adicionar quantidades adicionais da enzima ao sistema, assim como a recuperação das enzimas imobilizadas que foram usadas (TAMBORINI et al., 2018). No entanto, o uso de reatores de fluxo tem a vantagem de aumentar a taxa de transferência de massa e, conseqüentemente, a taxa de reação, causando uma diminuição no tempo de reação e possibilitando reação em larga escala usando equipamentos consideravelmente de pequena escala (ARSHI; NOZARI-ASBEMARZ; MAGNER, 2020).

O uso de biocatalisadores enzimáticos para realizar catálise para obtenção de produtos químicos é considerado limitado, pois há necessidade de altas concentrações de enzimas (COSGROVE et al., 2019). Portanto, o estudo e desenvolvimento de biorreatores que proporcionem vantagens na síntese enzimática deve continuar a ser realizado para encontrar um equilíbrio entre produção e gastos.

2.9. TENDÊNCIAS FUTURAS

A crescente demanda global por tecnologias verdes tem aumentado a busca por produtos de origem natural que evitem ou causem menos danos ao meio ambiente. Assim, o processamento de biolubrificantes à base de óleos vegetais parece ser um processo livre de poluição, além de ser renovável. O uso de lipases na síntese desses produtos oferece uma alternativa mais limpa que os catalisadores químicos, e muitos estudos têm sido realizados para viabilizar seu uso. Para isso, diferentes técnicas de imobilização enzimática têm sido aplicadas, promovendo um aumento na estabilidade da enzima e proporcionando seu reuso.

O estudo de Wafti *et al.* 2021, revela que os catalisadores enzimáticos não são afetados pelo teor de ácidos graxos livres (AGL). Portanto, eles podem mitigar reações colaterais, reduzindo o custo de separação do produto. Confirmaram que as propriedades do éster de trimetilolpropano (TMP) produzido a partir da transesterificação enzimática são comparáveis a outros biolubrificantes à base de óleo vegetal produzidos por transesterificação química, sendo uma técnica alternativa para a produção de biolubrificantes de alto desempenho (WAFTI et al., 2021).

A aplicação de nanopartículas como suporte de imobilização para a produção de biocatalisadores enzimáticos tem apresentado excelentes resultados, e seu uso parece ser promissor na síntese de biolubrificantes. Sarno *et al.* (2019), comprovou seu grande potencial nesses processos, imobilizando a lipase de *Thermomyces lanuginosus* em nanopartículas de magnetita modificadas com ácido cítrico. Como resultado, obtiveram

biocatalisadores com recuperação de atividade de aproximadamente 99%. Podemos sintetizar a produção de biolubrificantes com conversão máxima de 94% após 24h, sendo observado aumento na taxa de conversão com a adição de peneiras moleculares (SARNO; IULIANO; CIRILLO, 2019).

Biocatalisadores produzidos sem suporte sólido também têm atraído a atenção de muitos pesquisadores (VERMA; KUMAR; KUMAR, 2019; WANG et al., 2017; XU et al., 2020). Guimarães *et al.* (2021), avaliou o desempenho do agregado enzimático reticulado magnético previamente otimizado da lipase Eversa® Transform na síntese enzimática de biolubrificantes por transesterificação de óleo de cozinha residual com diferentes álcoois. Concluíram que a enzima imobilizada teve melhor desempenho nas reações de esterificação e transesterificação, sendo cerca de três vezes mais ativa que a enzima livre, tornando-a adequada para os fins aplicados (GUIMARÃES et al., 2021b). Portanto, cabe ressaltar que todas as técnicas aqui citadas apresentam propostas de aplicação de lipases para a produção de biolubrificantes mais limpos, reduzindo custos e tornando-os mais sustentáveis.

2.10. REFERÊNCIAS

- ABIFARIN, J. K.; PRAKASH, C.; SINGH, S. Optimization and significance of fabrication parameters on the mechanical properties of 3D printed Chitosan/PLA scaffold. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2021.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013.
- AFIFAH, A. N. et al. Synthesis and tribological studies of epoxidized palm stearin methyl ester as a green lubricant. **Journal of Cleaner Production**, v. 280, 2021.
- AGHAEI, H.; YASINIAN, A.; TAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 178, p. 569–579, 2021.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, nov. 2014.
- AGUIEIRAS, É. C. G. et al. Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials. **Renewable Energy**, v. 148, n. xxxx, p. 689–696, 2020.
- ALAFAGHANI, A.; QATTAWI, A. Investigating the effect of fused deposition modeling processing parameters using Taguchi design of experiment method. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 36, n. December 2017, p. 164–174, 2018.
- ALMASI, S. et al. A review on bio-lubricant production from non-edible oil-bearing biomass resources in Iran: Recent progress and perspectives. **Journal of Cleaner Production**, v. 290, p. 125830, mar. 2021.
- ALMEIDA, J. M. et al. Metagenomics: Is it a powerful tool to obtain lipases for application in biocatalysis? **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1868, n. 2, p. 140320, 2020.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, 1990.
- AMINI, Z. et al. Biodiesel production by lipase-catalyzed transesterification of *Ocimum basilicum* L. (sweet basil) seed oil. **Energy Conversion and Management**, v. 132, p. 82–90, 2017.
- AMIRIL, S. A. S. et al. Tribological investigations on the application of oil-miscible ionic liquids additives in modified *Jatropha*-based metalworking fluid. **Tribology International**, v. 120, p. 520–534, 2018.
- ANGULO, B. et al. Bio-lubricants production from fish oil residue by transesterification with trimethylolpropane. **Journal of Cleaner Production**, v. 202, p. 81–87, nov. 2018.
- ANNISA, A. N.; WIDAYAT, W. A Review of Bio-lubricant Production from Vegetable Oils Using Esterification Transesterification Process. **MATEC Web of Conferences**, v. 156, p. 1–7, 2018.
- ANTONINO, R. S. C. M. D. Q. et al. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n.

5, 2017.

ANTONIO, D. C.; AMANCIO, L. P.; ROSSET, I. G. Biocatalytic Ethanolysis of Waste Chicken Fat for Biodiesel Production. **Catalysis Letters**, v. 148, n. 10, p. 3214–3222, 2018.

ARAD, S. (MALIS) et al. Superior Biolubricant from a Species of Red Microalga. **Langmuir**, v. 22, n. 17, p. 7313–7317, ago. 2006.

ARMYLISAS, A. H. N. et al. Excellent Properties of Dimer Fatty Acid Esters as Biolubricant Produced by Catalyst- and Solvent-Free Esterification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 11, p. 1–8, 2019.

ARSHI, S.; NOZARI-ASBEMARZ, M.; MAGNER, E. **Enzymatic bioreactors: An electrochemical perspective** Catalysts, 2020.

ARUN, S. et al. Algae based microbial fuel cells for wastewater treatment and recovery of value-added products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 132, p. 110041, out. 2020.

ASSIS, O. B. G. Scanning electron microscopy study of protein immobilized on SiO₂ sol-gel surfaces. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 3, p. 339–342, 2003.

ATTIA, N. K. et al. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, v. 271, n. March, p. 117578, 2020.

BAHADI, M. et al. Optimization of response surface methodology by D-optimal design for synthesis of food-grade palm kernel based biolubricant. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. April, 2019.

BALALI, S. et al. Preparation and Characterization of Composite Blends Based on Polylactic Acid/Polycaprolactone and Silk. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 11, 2018.

BARBOSA, M. S. et al. Biolubricant production under zero-waste Moringa oleifera Lam biorefinery approach for boosting circular economy. **Industrial Crops and Products**, v. 167, n. November 2020, 2021.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: Sources, applications and properties - A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15–29, 2010.

BASHIR, N.; SOOD, M.; BANDRAL, J. D. Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. **International Journal of Chemical Studies**, v. 8, n. 2, p. 254–261, 2020.

BASHIRI, S. et al. Chemical modification of sunflower waste cooking oil for biolubricant production through epoxidation reaction. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 4, p. 119–127, 2021.

BASSI, J. J. et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900–909, 2016.

BASU, S. et al. Green biolubricant infused slippery surfaces to combat marine biofouling. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 568, p. 185–197, 2020.

- BAYRAMOGLU, G. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. **Food Chemistry**, v. 366, n. April 2021, p. 130699, 2022.
- BEDOYA, O. F.; TISCHER, I. Detección de homología remota de proteínas usando modelos 3D enriquecidos con propiedades fisicoquímicas. **INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD**, v. 17, n. 1, 2015.
- BEN HLIMA, H. et al. Molecular and Structural Characterizations of Lipases from *Chlorella* by Functional Genomics. **Marine drugs**, v. 19, n. 2, 2021.
- BENÍTEZ-MATEOS, A. I.; CONTENTE, M. L. Agarose vs. Methacrylate as material supports for enzyme immobilization and continuous processing. **Catalysts**, v. 11, n. 7, 2021.
- BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Lipases in organic solvents: The fatty acid chain length profile. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 9, p. 641–645, 1991.
- BERING, L.; THOMPSON, J.; MICKLEFIELD, J. **New reaction pathways by integrating chemo- and biocatalysis** *Trends in Chemistry*, 2022.
- BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.
- BEZERRA, R. DE C. DE F. et al. Babassu-oil-based biolubricant: Chemical characterization and physicochemical behavior as additive to naphthenic lubricant NH-10. **Industrial Crops and Products**, v. 154, n. November 2019, p. 112624, 2020a.
- BEZERRA, R. M. et al. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, n. March, p. 109560, 2020b.
- BHATIA, R. B. et al. Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 8, p. 2434–2441, 2000.
- BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells: Some Practical Considerations. **Immobilization of Enzymes and Cells**, v. 1, p. 1–12, 2003.
- BOLINA, I. C. A.; GOMES, R. A. B.; MENDES, A. A. Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: Current Scenario and Future Perspectives. **Bioenergy Research**, 2021.
- 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, 2018.
- BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 29, p. 3336–3337, 2003.
- BOSCOLO, B.; TROTTA, F.; GHIBAUDI, E. High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 2, p. 155–161, 2010.

- BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, n. November 2019, p. 66–80, 2020.
- BOULANGER, J. et al. Palladium-catalyzed hydroesterification of olefins with isosorbide in standard and Brønsted acidic ionic liquids. **Catalysis Communications**, v. 69, p. 143–146, 2015.
- 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. 248–254, 1976.
- BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of enzymes: A literature survey. **Methods in Molecular Biology**, v. 1051, p. 15–31, 2013.
- BRENNEIS, R.; BAECK, B. Esterification of fatty acids using *Candida antarctica* lipase A in water-abundant systems. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 8, 2012.
- BRIFFA, J.; SINAGRA, E.; BLUNDELL, R. **Heavy metal pollution in the environment and their toxicological effects on humans** *Heliyon*, 2020.
- BUESO, F. et al. Lipase-catalyzed biodiesel production and quality with *Jatropha curcas* oil: Exploring its potential for Central America. **Journal of Biological Engineering**, v. 9, n. 1, 2015.
- BUSSAMARA, R. et al. Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubeiensis* (Strain HB85A) lipase by adsorption in a packed-bed reactor by response surface methodology. **Enzyme Research**, v. 2012, 2012.
- CALIFANO, V.; COSTANTINI, A. **Immobilization of cellulolytic enzymes in mesostructured silica materials** *Catalysts*, 2020.
- CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.
- CAO, Q. et al. Hydrophobicity and physicochemical properties of agarose film as affected by chitosan addition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, 2018.
- CARNEIRO, E. A. et al. IMPROVING the CATALYTIC FEATURES of the LIPASE from *Rhizomucor miehei* IMMOBILIZED on CHITOSAN-BASED HYBRID MATRICES by ALTERING the CHEMICAL ACTIVATION CONDITIONS. **Quimica Nova**, v. 43, n. 9, p. 1234–1239, 2020.
- CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F. Lipases and Phospholipases. **Methods Mol Biol**, v. 861, p. 3–30, 2012.
- CAVALCANTE, A. L. G. et al. Preparation, Characterization, and Enantioselectivity of Polyacrylate Microcapsules Entrapping *Ananas comosus* Extract. **Revista Virtual de Quimica**, v. 13, n. 6, p. 1319–1329, 2021a.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. **Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis** *Fuel* Elsevier Ltd, , 15 mar. 2020.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Designing of Nanomaterials-Based Enzymatic Biosensors: Synthesis, Properties, and Applications. **Electrochem**, v. 2, n. 1, p. 149–184, 2021b.

- CAVALCANTE, F. T. T. et al. **Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization** *Catalysts*, 2021c.
- CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, v. 215, n. October 2017, p. 705–713, 2018.
- CECILIA, J. A. et al. An overview of the biolubricant production process: Challenges and future perspectives. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 1–24, 2020.
- CEN, Y. et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- CERÓN, A. A. et al. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 166–172, 2018.
- CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 491–499, 2013.
- CHAN, C. H. et al. **Tribological behavior of biolubricant base stocks and additives** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.05.024>>
- CHANDRA DEY, S. et al. PREPARATION , CHARACTERIZATION AND PERFORMANCE EVALUATION OF CHITOSAN AS AN ADSORBENT FOR REMAZOL RED. **International Journal of Latest Research in Engineering and Technology**, 2016.
- CHANDRA, P. et al. **Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review**. [s.l.] BioMed Central, 2020. v. 19
- CHANG, M. Y.; CHAN, E. S.; SONG, C. P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase methanol tolerance and kinetic model. **Fuel**, v. 283, n. October 2020, 2021.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 20–29, 2018.
- CHATURVEDI, S. K. et al. Unraveling comparative anti-amyloidogenic behavior of pyrazinamide and D-Cycloserine: A mechanistic biophysical insight. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- CHEAH, M. Y. et al. Physicochemical and tribological properties of microalgae oil as biolubricant for hydrogen-powered engine. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 45, n. 42, p. 22364–22381, ago. 2020.
- CHEN, M. et al. Porous organic polymer-supported palladium catalyst for hydroesterification of olefins. **Molecular Catalysis**, v. 498, n. October, p. 111239, 2020.
- CHEN, S.; WU, T.; ZHAO, C. Conversion of lipid into high-viscosity branched biolubricant base oil. **Green Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 7348–7354, 2020.
- CHENTHAMARAKSHAN, A. et al. Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, nov. 2015.
- CHOWDHURY, A.; MITRA, D.; BISWAS, D. Biolubricant synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 1, 2013.
- CHU, R. et al. A review on co-cultivation of microalgae with filamentous fungi: Efficient harvesting, wastewater treatment and biofuel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 139, p. 110689, abr. 2021.
- CONTESINI, F. J. et al. Advances in recombinant lipases: application in the pharmaceutical industry. **Catalysts**, v. 10, p. 1–33, 2020.
- COSGROVE, S. C. et al. Biocatalytic Oxidation in Continuous Flow for the Generation of Carbohydrate Dialdehydes. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 12, 2019.
- COSKUN, O. Separation Techniques: CHROMATOGRAPHY. **Northern Clinics of Istanbul**, 2016.
- COSTA, M. J. et al. Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 157, n. June, p. 108131, 2020.
- DA FONSECA, A. M. et al. Synthesis, biological activity, and in silico study of bioesters derived from bixin by the calb enzyme. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 5901–5917, 2022.
- DA S. MOREIRA, K. et al. Taguchi design-assisted Co-immobilization of Lipase A and B from *Candida antarctica* onto Chitosan: characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 7, p. 223–244, 2021.
- DA SILVA, A. P. T. et al. Enzymatic catalysis: An environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, n. April, p. 117786, 2020.
- DA SILVA, J. A. C. et al. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, 2015.
- DA SILVA, L. R. et al. Study of 3D parameters and residual stress in grinding of AISI 4340 steel hardened using different cutting fluids. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, v. 100, n. 1–4, p. 895–905, jan. 2019.
- DA SILVA, V. C. F.; CONTESINI, F. J.; CARVALHO, P. D. O. Characterization and catalytic activity of free and immobilized lipase from *Aspergillus niger*: A comparative study. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 8, p. 1468–1474, 2008.
- DANTAS, A. et al. Potential application of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) immobilized on nonporous polystyrene particles. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 38, n. 2, p. 608–613, 2019.
- DARMINESH, S. P. et al. Recent development on biodegradable nanolubricant: A review. **International Communications in Heat and Mass Transfer**, v. 86, p. 159–165,

ago. 2017.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.

DE OLIVEIRA, A. L. B. et al. **Lipases immobilized onto nanomaterials as biocatalysts in biodiesel production: Scientific context, challenges, and opportunities** *Revista Virtual de Quimica*, 2021a.

DE OLIVEIRA, A. L. L. et al. Waste of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) to Biodiesel Production by Enzymatic Catalysis—Optimization Using Factorial Experimental Design. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 60, n. 9, p. 3554–3560, mar. 2021b.

DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 2018.

DE SOUZA, R. M. et al. **Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review** *Process Safety and Environmental Protection*, 2020a.

DE SOUZA, T. C. et al. Modulation of lipase B from *Candida antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanyl acetate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 12, p. 2253–2268, 1 dez. 2020b.

DEGHANI SOUFI, M. et al. Valorization of waste cooking oil based biodiesel for biolubricant production in a vertical pulsed column: Energy efficient process approach. **Energy**, v. 189, 2019.

DO VALLE, C. P. et al. Chemical modification of Tilapia oil for biolubricant applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 191, p. 158–166, 2018.

DOS SANTOS, J. C. S. et al. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015.

DOS SANTOS, L. K. et al. Experimental factorial design on hydroesterification of waste cooking oil by subcritical conditions for biodiesel production. **Renewable Energy**, v. 114, p. 574–580, 2017.

DROUT, R. J.; ROBISON, L.; FARHA, O. K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 381, p. 151–160, 2019.

EL-HAMSHARY, H.; AL-SIGENY, S.; ALI, M. M. Synthesis and biological study of some amino acid functionalized starch-graft-polyacrylamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 64, n. 2, p. 282–286, 2006.

ELIAS, N. et al. Taguchi orthogonal design assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto nanocellulose-silica reinforced polyethersulfone membrane: physicochemical characterization and operational stability. **Cellulose**, v. 28, n. 9, p. 5669–5691, 2021.

ELSHOBARY, M. E. et al. Recent insights into microalgae-assisted microbial fuel cells for generating sustainable bioelectricity. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 4, p. 3135–3159, jan. 2021.

- ENCINAR, J. M. et al. Biolubricants from rapeseed and castor oil transesterification by using titanium isopropoxide as a catalyst: Production and characterization. **Catalysts**, v. 10, n. 4, 2020.
- ENCINAR, J. M.; NOGALES, S.; GONZÁLEZ, J. F. Biodiesel and biolubricant production from different vegetable oils through transesterification. **Engineering Reports**, v. 2, n. 12, p. 1–10, 2020.
- FARAG, M. A. E. A. M. et al. Congestive heart failure as a rare cause of unilateral breast edema: A case report & review of the literature. **Egyptian Journal of Radiology and Nuclear Medicine**, v. 49, n. 3, p. 873–877, 2018.
- FAROBIE, O.; MATSUMURA, Y. State of the art of biodiesel production under supercritical conditions. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 63, p. 173–203, 2017.
- FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 116, n. February, p. 90–96, 2018.
- FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, v. 362, n. March, p. 122–129, 2021.
- FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83868–83875, 2015.
- FERREIRA, A. R. O. et al. Sulfonated activated carbons as potential catalysts for biolubricant synthesis. **Molecular Catalysis**, v. 488, n. January, p. 110888, 2020.
- FERREIRA DE MELLO, B. T. et al. Hydroesterification of crambe oil (*Crambe abyssinica* H.) under pressurized conditions. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 110–119, 2017.
- FERREIRA, E. N. et al. Investigation of the thermal degradation of the biolubricant through TG-FTIR and characterization of the biodiesel – Pequi (*Caryocar brasiliensis*) as energetic raw material. **Fuel**, v. 245, n. February, p. 398–405, 2019.
- FERREIRA GONÇALVES, G. R. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111, n. October, p. 114–123, 2021.
- FERREIRA MOTA, G. et al. **Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects** *Algal Research*, 2022.
- FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.
- FOLSTER, C. P. et al. Development and applications of selective hydroesterification reactions. **Trends in Chemistry**, v. 3, n. 6, p. 469–484, jun. 2021.
- FONSECA, A. M. DA et al. Enzymatic Biocatalyst using enzymes from Pineapple (*Ananas comosus*) Peel Immobilized in Hydrogel Beads. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 23, p. 32, 2019.
- FONSECA, J. M. et al. Ethyl esters from waste oil: Reaction data of non-catalytic

hydroesterification at pressurized conditions and purification with sugarcane bagasse ash. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 4988–4996, 2018.

FONSECA, T. DE S. et al. Lipase mediated enzymatic kinetic resolution of phenylethyl halohydrins acetates: A case of study and rationalization. **Molecular Catalysis**, v. 485, n. September 2019, p. 110819, 2020.

FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 653–658, 2019.

FU, J.; REINHOLD, J.; WOODBURY, N. W. Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, 2011.

FUKUI, Y.; INAMURA, R.; FUJIMOTO, K. Preparation of agarose xerogel nanoparticles by solvent evaporation from water nanodroplets. **Polymer Journal**, v. 53, n. 7, 2021.

GAIDE, T. et al. Hydroesterification of methyl 10-undecenoate in thermomorphic multicomponent solvent systems—Process development for the synthesis of sustainable polymer precursors. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 99, p. 197–204, 2016.

GARCÍA-GALÁN, M. J. et al. Fate of priority pharmaceuticals and their main metabolites and transformation products in microalgae-based wastewater treatment systems. **Journal of Hazardous Materials**, v. 390, p. 121771, maio 2020.

GHAFFAR, F. et al. Study on the Potential of Waste Cockle Shell Derived Calcium Oxide for Biolubricant Production. **Materials Today: Proceedings**, v. 19, p. 1346–1353, 2019.

GHASEMI, S. et al. Covalent binding and in-situ immobilization of lipases on a flexible nanoporous material. **Process Biochemistry**, v. 102, n. July 2020, p. 92–101, 2021.

GHAZALI, H. M.; HAMIDAH, S.; CHE MAN, Y. B. Enzymatic transesterification of palm olein with nonspecific and 1,3-specific lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 6, p. 633–639, 1995.

GŁĄB, M. et al. Multistep chemical processing of crickets leading to the extraction of chitosan used for synthesis of polymer drug carriers. **Materials**, v. 14, n. 17, 2021.

GRECO-DUARTE, J. et al. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. **Fuel**, v. 202, p. 196–205, 2017.

GRECO-DUARTE, J. et al. Understanding the degree of estolide enzymatic polymerization and the effects on its lubricant properties. **Fuel**, v. 245, 2019.

GRYGLEWICZ, S.; MUSZYŃSKI, M.; NOWICKI, J. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 25–29, fev. 2013.

GUERRAND, D. Lipases industrial applications: Focus on food and agroindustries. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 24, n. 4, 2017.

GUIMARÃES, J. R. et al. Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology Using Waste Cooking Oil. **Molecules**, v. 23, n. 1, p. 193, 2021a.

GUIMARÃES, J. R. et al. Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology

Converts It in a Suitable Biocatalyst for Biolubricant Production Using Waste Cooking Oil. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 193, jan. 2021b.

GUL, M. et al. Effect of TMP-based-cottonseed oil-biolubricant blends on tribological behavior of cylinder liner-piston ring combinations. **Fuel**, v. 278, n. June, p. 118242, 2020.

GUPTA, J.; AGARWAL, M.; DALAI, A. K. **An overview on the recent advancements of sustainable heterogeneous catalysts and prominent continuous reactor for biodiesel production** **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, 2020.

GUPTA, S. et al. Effect of Jojoba oil based biolubricant additive on the friction and wear characteristics of the Al-7Si alloy. **Materials Today: Proceedings**, v. 26, p. 2681–2684, 2019.

GÜR, S. D.; İDİL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 538–552, 2018.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; WOJCIESZYNSKA, D. **Immobilization as a strategy for improving enzyme properties- Application to oxidoreductases** **Molecules**, 2014.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. Biolubricant production from castor oil in a magnetically stabilized fluidized bed reactor using lipase immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles. **Industrial Crops and Products**, v. 94, 2016.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

HAMA, S.; KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 386–395, maio 2013.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, dez. 2012.

HEIKAL, E. K. et al. Manufacturing of environment friendly biolubricants from vegetable oils. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 26, n. 1, p. 53–59, 2017.

HO, C. K.; MCAULEY, K. B.; PEPPLEY, B. A. Biolubricants through renewable hydrocarbons: A perspective for new opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 113, n. February, p. 109261, 2019.

HOMAEI, A. A. et al. Enzyme immobilization: An update. **Journal of Chemical Biology**, v. 6, n. 4, p. 185–205, 2013.

HOONG, S. S. et al. Synthesis and physicochemical properties of novel lauric acid capped estolide esters and amides made from oleic acid and their evaluations for biolubricant basestock. **Industrial Crops and Products**, v. 140, n. April, p. 111653, 2019.

HOPKINS, A. L.; GROOM, C. R. The druggable genome. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 9, p. 727–730, 2002.

HOSSAIN, M. A. et al. Development of catalyst complexes for upgrading biomass into ester-based biolubricants for automotive applications: a review. **RSC Advances**, v. 8, n.

10, p. 5559–5577, 2018.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: An overview. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology**, v. 118, n. 1–3, p. 155–170, 2004.

HU, Z. et al. Preparation and characterization of chitosan-agarose composite films. **Materials**, v. 9, n. 10, 2016.

HUSSAIN, F. et al. **Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review** **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110603>>

IHSANULLAH, I. et al. **Bioremediation of dyes: Current status and prospects** **Journal of Water Process Engineering**, 2020.

ISAH, S. et al. Synthesis of Dimer Acid 2-Ethylhexyl Esters and their Physicochemical Properties as Biolubricant Base Stock and their Potential as Additive in Commercial Base Oils. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 98, n. 6, p. 683–695, 2021.

ISMAIL, A. R.; KASHTOH, H.; BAEK, K. H. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, n. May, p. 127–142, 2021.

IVAN-TAN, C. T. et al. Screening of solid base catalysts on palm oil based biolubricant synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 148, p. 441–451, 2017.

JACKSON, E.; CORREA, S.; BETANCOR, L. Cellulose-Based Nanosupports for Enzyme Immobilization. In: [s.l: s.n.]. p. 1235–1253.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 390–397, 1 ago. 2002.

JAIWAL, K. K. et al. Microalgae fuel cell for wastewater treatment: Recent advances and challenges. **Journal of Water Process Engineering**, v. 38, p. 101549, dez. 2020.

JOYCE, K. et al. **Bioactive potential of natural biomaterials: identification, retention and assessment of biological properties** **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2021.

KADRI, T. et al. **Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by fungal enzymes: A review** **Journal of Environmental Sciences (China)**, 2017.

KANIA, D. et al. A review of biolubricants in drilling fluids: Recent research, performance, and applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 135, p. 177–184, 2015.

KARMAKAR, B.; DHAWANE, S. H.; HALDER, G. Optimization of biodiesel production from castor oil by Taguchi design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2684–2695, abr. 2018.

KIM, H. et al. Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. **Renewable Energy**, v. 130, p. 489–494, 2019.

- KIM, T. H. et al. The role of dimer asymmetry and protomer dynamics in enzyme catalysis. **Science**, v. 355, n. 6322, 2017.
- KLEINAITE, E. et al. A cleaner approach for biolubricant production using biodiesel as a starting material. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, 2014.
- KOHEN, A. Role of dynamics in enzyme catalysis: Substantial versus semantic controversies. **Accounts of Chemical Research**, v. 48, n. 2, p. 466–473, 2015.
- KUJAWA, J. et al. Highly effective enzymes immobilization on ceramics: Requirements for supports and enzymes. **Science of the Total Environment**, v. 801, 2021.
- KUMAR, A. et al. Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, p. 1–11, 2016.
- KUMAR, A.; CHAUHAN, S. **Pancreatic lipase inhibitors: The road voyaged and successes** *Life Sciences*, 2021.
- KUMAR, R. R. et al. **Lipase – The fascinating dynamics of enzyme in seed storage and germination – A real challenge to pearl millet** *Food Chemistry*, 2021.
- KURALAY, F. Nanomaterials-Based Enzyme Biosensors for Electrochemical Applications: Recent Trends and Future Prospects. In: **New Developments in Nanosensors for Pharmaceutical Analysis**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 381–408.
- KUZMINSKA, M.; BACKOV, R.; GAIGNEAUX, E. M. Behavior of cation-exchange resins employed as heterogeneous catalysts for esterification of oleic acid with trimethylolpropane. **Applied Catalysis A: General**, v. 504, p. 11–16, 2015.
- LAGE, F. A. P. et al. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.
- LAI, O. M. et al. Lipase/Esterase: Properties and industrial applications. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.: s.n.]. p. 158–167.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, 1993.
- LI, B. et al. Biodiesel preparation from high acid value phoenix seed oil using Eversa transform 2.0 as a novel catalyst. **Biomass Conversion and Biorefinery**, n. 4, 2021.
- LI, K. et al. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, n. June, p. 258–268, 2018.
- LI, S. et al. Technology prospecting on enzymes: Application, marketing and engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, 1 set. 2012.
- LIMA, G. V. et al. Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 546, p. 7–14, 25 set. 2017.
- LIMA, P. J. M. et al. An overview on the conversion of glycerol to value-added industrial products via chemical and biochemical routes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.2098, jan. 2021.

- LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, 2018.
- LIU, L. et al. Analysis of tyrosinase binders from Glycyrrhiza uralensis root: Evaluation and comparison of tyrosinase immobilized magnetic fishing-HPLC and reverse ultrafiltration-HPLC. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 932, p. 19–25, 2013.
- LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, n. August, p. 396–408, 2021.
- LIU, T. T. et al. **Lipase Inhibitors for Obesity: A Review** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2020.
- LIU, W.; LI, M.; YAN, Y. Heterologous expression and characterization of a new lipase from *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 and used for biodiesel production. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.
- LIVAGE, J.; CORADIN, T. Encapsulation of enzymes, antibodies, and bacteria. In: **Handbook of Sol-Gel Science and Technology: Processing, Characterization and Applications**. [s.l.: s.n.]. p. 2909–2931.
- MA, X. et al. Enzyme-catalyzed synthesis and properties of polyol ester biolubricant produced from *Rhodotorula glutinis* lipid. **Biochemical Engineering Journal**, v. 173, n. March, p. 108101, 2021.
- MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. A review on suspension polymerization processes. **Polimeros**, v. 17, n. 2, p. 166–179, 2007.
- MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 3, n. 1, p. 193–217, 1985.
- MADANKAR, C. S.; DALAI, A. K.; NAIK, S. N. Green synthesis of biolubricant base stock from canola oil. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 139–144, 2013.
- MASUDI, A.; MURAZA, O. Vegetable Oil to Biolubricants: Review on Advanced Porous Catalysts. **Energy & Fuels**, v. 32, n. 10, p. 10295–10310, out. 2018.
- MCNUTT, J.; HE, Q. S. Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, p. 1–12, 2016.
- MEGHWANSHI, G. K. et al. Enzymes for pharmaceutical and therapeutic applications. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, n. 4, p. 586–601, 2020.
- MEHROTRA, P. Biosensors and their applications – A review. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 6, n. 2, p. 153–159, maio 2016.
- MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, 2020.
- MELO, A. D. Q. et al. Synthesis of benzyl acetate catalyzed by lipase immobilized in nontoxic chitosan-polyphosphate beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2165, 7 dez. 2017.
- MIGNEAULT, I. et al. **Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking** *BioTechniques*, 2004.

- MIGUEZ, J. P. et al. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, 2018.
- MIRANDA, L. P. et al. Composites of crosslinked aggregates of eversa® transform and magnetic nanoparticles. Performance in the ethanolysis of soybean oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 9–11, 2020.
- MO, H.; QIU, J. Preparation of chitosan/magnetic porous biochar as support for cellulase immobilization by using glutaraldehyde. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 1–14, 2020.
- MOBARAK, H. M. et al. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34–43, 2014.
- MOEHLENBROCK, M. J.; MINTEER, S. D. Introduction to the field of enzyme immobilization and stabilization. **Methods in Molecular Biology**, v. 1504, p. 1–7, 2017.
- MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.
- MOHAMMAD MIRZAIE, M. A. et al. Statistical evaluation and modeling of cheap substrate-based cultivation medium of *Chlorella vulgaris* to enhance microalgae lipid as new potential feedstock for biolubricant. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 46, n. 4, p. 368–375, maio 2016a.
- MOHAMMAD MIRZAIE, M. A. et al. Kinetic modeling of mixotrophic growth of *Chlorella vulgaris* as a new feedstock for biolubricant. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 5, p. 2707–2717, out. 2016b.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 17 ago. 2019a.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from *Candida antarctica* Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts' Performance under Ultrasonic Irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5807, 19 nov. 2019b.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. **Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?** **Renewable Energy**, 2021a.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141–154, 2021b.
- MOREIRA, K. DA S. et al. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 693, 30 jun. 2020.
- MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.
- MORTAZAVI, S.; AGHAEI, H. Make proper surfaces for immobilization of enzymes:

Immobilization of lipase and α -amylase on modified Na-sepiolite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1–12, 2020.

MOWLA, O.; KENNEDY, E.; STOCKENHUBER, M. In-situ FTIR study on the mechanism of both steps of zeolite-catalysed hydroesterification reaction in the context of biodiesel manufacturing. **Fuel**, v. 232, n. January, p. 12–26, 2018.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. **Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase** *Biotechnology Letters*, 2013.

NASSEAU, M. et al. Substrate-permeable encapsulation of enzymes maintains effective activity, stabilizes against denaturation, and protects against proteolytic degradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 5, p. 615–618, 2001.

NAZOR, J.; LIU, J.; HUISMAN, G. Enzyme evolution for industrial biocatalytic cascades. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 182–190, 2021.

NERY, E. W.; KUBOTA, L. T. Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices-A glucose oxidase study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 551–559, 2016.

NOGALES-DELGADO, S.; ENCINAR, J. M.; GONZÁLEZ CORTÉS, Á. High oleic safflower oil as a feedstock for stable biodiesel and biolubricant production. **Industrial Crops and Products**, v. 170, p. 113701, 2021.

NUNES, Y. L. et al. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalysts: How to choose the best strategy? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 1124–1170, 2021.

NWAGU, T. N.; OKOLO, B.; AOYAGI, H. Immobilization of raw starch saccharifying amylase on glutaraldehyde activated chitin flakes increases the enzyme operation range. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, n. December 2020, p. 100645, 2021.

OJUEDERIE, O. B.; BABALOLA, O. O. **Microbial and plant-assisted bioremediation of heavy metal polluted environments: A review** *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2017.

OKORO, O. V.; SUN, Z.; BIRCH, J. Lipases for Biofuel Production. In: **Encyclopedia of Food Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 150–157.

OKURA, N. S. et al. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 550–561, 15 nov. 2020.

OLIVEIRA, M.; MAGRINI, A. Life Cycle Assessment of Lubricant Oil Plastic Containers in Brazil. **Sustainability**, v. 9, n. 4, p. 576, abr. 2017.

ONG, Y. T. et al. A review on carbon nanotubes in an environmental protection and green engineering perspective. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 2, p. 227–242, 2010.

OWUNA, F. J. et al. Chemical modification of vegetable oils for the production of biolubricants using trimethylolpropane: A review. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 29, n. 1, p. 75–82, 2020.

OZBOYACI, M. et al. **Modeling and simulation of protein-surface interactions:**

Achievements and challenges *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2016.

PADILHA, G. DA S. et al. Extraction of lipase from *Burkholderia cepacia* by PEG/Phosphate APTS and its biochemical characterization. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 1, p. 7–19, 2012.

PAL, G. et al. Modelagem molecular de proteínas: o caso de uma glucuronosiltransferase (GumK) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 3, 2014.

PANCHAL, T. M. et al. **A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2017.

PANDEY, C. M.; MALHOTRA, B. D. **Biosensors: Fundamentals and applications**. [s.l.: s.n.].

PANDEY, D.; DAVEREY, A.; ARUNACHALAM, K. Biochar: Production, properties and emerging role as a support for enzyme immobilization. **Journal of Cleaner Production**, v. 255, p. 120267, 2020.

PAPADAKI, A. et al. Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. **Bioresource Technology**, v. 267, 2018.

PARENTE, E. J. et al. Production of biolubricants from soybean oil: Studies for an integrated process with the current biodiesel industry. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 165, p. 456–466, 2021a.

PARENTE, E. J. et al. Production of biolubricants from soybean oil: Studies for an integrated process with the current biodiesel industry. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 165, p. 456–466, jan. 2021b.

PARK, J. M. et al. Immobilization of lysozyme-CLEA onto electrospun chitosan nanofiber for effective antibacterial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 54, n. 1, p. 37–43, 2013.

PAROUL, N. et al. Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 3, 2011.

PARSA, P.; PAYDAYESH, A.; DAVACHI, S. M. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, 2019.

PATEL, R. N. Biocatalysis for synthesis of pharmaceuticals. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1252–1274, 2018.

PAUL, A. K. et al. In situ epoxidation of waste soybean cooking oil for synthesis of biolubricant basestock: A process parameter optimization and comparison with RSM, ANN, and GA. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 96, n. 7, p. 1451–1461, jul. 2018.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. **Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends**. *Thermochemica Acta. Anais...*2003

PEREIRA, A. R. et al. Advances in enzyme bioelectrochemistry. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 90, n. 1, p. 825–857, 2018.

- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.
- PIERRE, A. C. **The sol-gel encapsulation of enzymes****Biocatalysis and Biotransformation**, 2004.
- PINDIT, K. et al. Biolubricant basestocks synthesis using 5-step reaction from jatropha oil, soybean oil, and palm fatty acid distillate. **Industrial Crops and Products**, v. 166, n. March, p. 113484, 2021.
- PINHEIRO, B. B. et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 798–809, 2019a.
- PINHEIRO, B. B. et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 798–809, 2019b.
- POLLARIS, L. et al. Toluene diisocyanate and methylene diphenyl diisocyanate: asthmatic response and cross-reactivity in a mouse model. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 7, p. 1709–1717, 2016.
- POPPE, J. K. et al. **Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects****Biotechnology Advances**, 2015.
- PORTER, J. L.; RUSLI, R. A.; OLLIS, D. L. Directed Evolution of Enzymes for Industrial Biocatalysis. **ChemBioChem**, v. 17, n. 3, p. 197–203, 2016.
- POURMADADI, M. et al. The synthesis and characterization of double nanoemulsion for targeted Co-Delivery of 5-fluorouracil and curcumin using pH-sensitive agarose/chitosan nanocarrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102849, 2021.
- POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.
- QUAYSON, E. et al. Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 134, n. April, p. 110355, 2020.
- RAFIEE, F.; REZAEI, M. **Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications****International Journal of Biological Macromolecules**, 2021.
- RAJAENDRAN, V. et al. Synthesis and characterization of neopentyl glycol dioleate as a biolubricant base. **AIP Conference Proceedings**, v. 1678, p. 1–8, 2015.
- RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95–99, 1963.
- RAMOS, M. et al. Biodiesel production processes and sustainable raw materials. **Energies**, v. 12, n. 23, 2019.

- RANJBARI, N. et al. Improved features of a highly stable protease from *Penaeus vannamei* by immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide nanosheets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 564–572, 2019.
- RATHI, B. S.; KUMAR, P. S. Application of adsorption process for effective removal of emerging contaminants from water and wastewater. **Environmental Pollution**, v. 280, 2021.
- REEVES, C. J. et al. The influence of fatty acids on tribological and thermal properties of natural oils as sustainable biolubricants. **Tribology International**, v. 90, p. 123–134, 2015.
- REEVES, C. J.; SIDDAIAH, A.; MENEZES, P. L. A Review on the Science and Technology of Natural and Synthetic Biolubricants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 3, n. 1, p. 11, mar. 2017.
- REIS, C. C. L. B. C. et al. Design of immobilized enzyme biocatalysts: drawbacks and opportunities. **Química Nova**, v. 42, n. 7, p. 768–783, 2019a.
- REIS, C. L. B. et al. **Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities** *Química Nova*, 2019b.
- RIOS, Í. C. et al. Chemical modification of castor oil fatty acids (*Ricinus communis*) for biolubricant applications: An alternative for Brazil's green market. **Industrial Crops and Products**, v. 145, n. July 2019, p. 112000, 2020.
- RIOS, N. S. et al. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R,S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 246–258, 1 nov. 2016.
- RIOS, N. S. et al. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, v. 75, p. 99–120, 2018.
- RIOS, N. S. et al. Further stabilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 313–324, 2019a.
- RIOS, N. S. et al. Increasing the enzyme loading capacity of porous supports by a layer-by-layer immobilization strategy using PEI as glue. **Catalysts**, v. 9, n. 7, 2019b.
- ROBLES-MEDINA, A. et al. **Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production** *Biotechnology Advances*, 2009.
- ROCCHITTA, G. et al. Enzyme Biosensors for Biomedical Applications: Strategies for Safeguarding Analytical Performances in Biological Fluids. **Sensors**, v. 16, n. 6, p. 780, maio 2016.
- ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, n. 0123456789, 2020.
- RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.
- RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W. R. Electrochemical

- biosensors. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 5, p. 1747–1763, 26 abr. 2010.
- ROY, J. J.; ABRAHAM, T. E. Strategies in making cross-linked enzyme crystals. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3705–3721, 2004.
- RUFER, A. C. **Drug discovery for enzymes** *Drug Discovery Today*, 2021.
- RYDEL, T. J. et al. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. **Biochemistry**, v. 42, n. 22, p. 6696–6708, 2003.
- SABARINATH, S.; RAJENDRAKUMAR, P. K.; PRABHAKARAN NAIR, K. Evaluation of tribological properties of sesame oil as biolubricant with SiO₂ nanoparticles and imidazolium-based ionic liquid as hybrid additives. **Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part J: Journal of Engineering Tribology**, v. 233, n. 9, p. 1306–1317, 2019.
- SABOYA, R. M. A. et al. Synthesis of biolubricants by the esterification of free fatty acids from castor oil with branched alcohols using cationic exchange resins as catalysts. **Industrial Crops and Products**, v. 104, n. February, p. 52–61, 2017.
- SAEEDI GARAKANI, S. et al. Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 533–545, 2020.
- SAHIN, S.; OZMEN, I. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 184, p. 113195, 2020.
- SALIH, N.; SALIMON, J. A review on eco-friendly green biolubricants from renewable and sustainable plant oil sources. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 13303–13327, 2021.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86–96, 2015.
- SALIMON, J. et al. Synthesis, reactivity and application studies for different biolubricants. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2014.
- SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 5, p. 519–530, 2010.
- SAMIDIN, S.; SALIH, N.; SALIMON, J. Synthesis and characterization of trimethylolpropane based esters as green biolubricant basestock. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 13638–13651, 2021.
- SANKAR, S.; PONNURAJ, K. Less explored plant lipases: Modeling and molecular dynamics simulations of plant lipases in different solvents and temperatures to understand structure-function relationship. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 3546–3558, 2020.
- SANTANA, J. L. et al. Analysis of the performance of a packed bed reactor to production ethyl esters from crude vegetable oil using lipase immobilized in silica modified with protic ionic liquid. **Quimica Nova**, v. 41, n. 8, p. 891–898, 2018.
- SAPAWA, N.; FARHAN HANAFI, M.; SAMION, S. The Use of Palm Oil as New

Alternative Biolubricant for Improving Anti-Friction and Anti-Wear Properties. **Materials Today: Proceedings**, v. 19, p. 1126–1135, 2019.

SARAVANAN, A. et al. A review on catalytic-enzyme degradation of toxic environmental pollutants: Microbial enzymes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 419, 2021a.

SARAVANAN, A. et al. A review on algal-bacterial symbiotic system for effective treatment of wastewater. **Chemosphere**, v. 271, 2021b.

SARAVANAN, A. et al. Effective water/wastewater treatment methodologies for toxic pollutants removal: Processes and applications towards sustainable development. **Chemosphere**, v. 280, 2021c.

SARMAH, N. et al. **Recent advances on sources and industrial applications of lipases** **Biotechnology Progress**, 2018.

SARNO, M.; IULIANO, M.; CIRILLO, C. Optimized procedure for the preparation of an enzymatic nanocatalyst to produce a bio-lubricant from waste cooking oil. **Chemical Engineering Journal**, v. 377, 2019.

SATAR, R. et al. Role of glutaraldehyde in imparting stability to immobilized β -galactosidase systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 2017.

SAXENA, R. K. et al. **Microbial lipases: Potential biocatalysts for the future industry** **Current Science**, 1999.

SCHIRMER, C. et al. **An overview of drive systems and sealing types in stirred bioreactors used in biotechnological processes** **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2021.

SCHLEPÜTZ, M. et al. Lipase-catalysed synthesis of ester oils from biodiesel by-products. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, 2008.

SECUNDO, F. Conformational changes of enzymes upon immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6250–6261, 2013.

SERPA, J. DE F. et al. New nanocomposite made of cashew apple bagasse lignin and Fe₃O₄ for immobilizing of lipase B from *Candida antarctica* aiming at esterification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, n. November 2020, 2021.

SHARMA, U. C.; CHANDRA, A. K.; SACHAN, S. Investigation on Thermo-Oxidative Stability of Karanja Oil Derived Biolubricant Base Oil. **Asian Journal of Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 839–844, mar. 2019.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Streamlining design, engineering, and applications of enzymes for sustainable biocatalysis. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 24, p. 8032–8052, 2021.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SINGH, A. et al. The enzyme biorefinery platform for advanced biofuels production. **Bioresource Technology Reports**, v. 7, n. June, p. 100257, 2019.

SINGH, R. et al. Electrical, optical and electrophotochemical studies on agarose based biopolymer electrolyte towards dye sensitized solar cell application. **Measurement**

- Journal of the International Measurement Confederation**, v. 102, p. 214–219, 2017.
- SINGH, Y.; SHARMA, A.; SINGLA, A. Non-edible vegetable oil–based feedstocks capable of bio-lubricant production for automotive sector applications—a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 26, n. 15, p. 14867–14882, maio 2019.
- SIVAKANTHAN, S.; MADHUJITH, T. **Current trends in applications of enzymatic interesterification of fats and oils: A review**LWT, 2020.
- SOUZA, J. E. DA S. et al. A Comprehensive Review on the Use of Metal–Organic Frameworks (MOFs) Coupled with Enzymes as Biosensors. **Electrochem**, v. 3, n. 1, p. 89–113, 2022.
- SOUZA, J. E. S. et al. Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, 2020.
- STAUCH, B.; FISHER, S. J.; CIANCI, M. Open and closed states of Candida Antarctica lipase B: Protonation and the mechanism of interfacial activation. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 12, p. 2348–2358, 2015.
- SUGAHARA, V. H.; VARÉA, G. DA S. Immobilization of Beauveria bassiana lipase on silica gel by physical adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 842–850, 2014.
- SUN, H. et al. Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275–1284, 2018.
- SUN, S.; GUO, J.; CHEN, X. Biodiesel preparation from Semen Abutili (Abutilon theophrasti Medic.) seed oil using low-cost liquid lipase Eversa® transform 2.0 as a catalyst. **Industrial Crops and Products**, v. 169, n. May, p. 113643, 2021.
- TAHA, M. et al. Synthesis of novel derivatives of oxindole, their urease inhibition and molecular docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p. 3285–3289, 2015.
- TAMBORINI, L. et al. **Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification**Trends in Biotechnology, 2018.
- TASLIMI, P. et al. The biological activities, molecular docking studies, and anticancer effects of 1-arylsulfonylpyrazole derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 9, p. 3336–3346, 2021.
- TIAN, W. et al. CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W363–W367, 2018.
- TRINDADE XIMENES, I. A. et al. **Magnetic particles for enzyme immobilization: A versatile support for ligand screening**Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021.
- TRIVEDI, J. et al. Clean synthesis of biolubricant range esters using novel liquid lipase enzyme in solvent free medium. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 165, dez. 2015.
- TRIVEDI, T. J.; KUMAR, A. Efficient Extraction of Agarose from Red Algae Using Ionic Liquids. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 04, n. 04, 2014.
- TROJANOWSKA, A. et al. Technological solutions for encapsulation. **Physical**

Sciences Reviews, v. 2, n. 9, 2017.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 2009.

TRUPPO, M. D. Biocatalysis in the Pharmaceutical Industry: The Need for Speed. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 5, p. 476–480, 2017.

TULASHIE, S. K.; KOTOKA, F. The potential of castor, palm kernel, and coconut oils as biolubricant base oil via chemical modification and formulation. **Thermal Science and Engineering Progress**, v. 16, n. January, 2020.

TURCO, R. et al. Synthesis of biolubricant basestocks from epoxidized soybean oil. **Catalysts**, v. 7, n. 10, 2017.

UGWUODO, C. J.; NWAGU, T. N. **Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: A review of literature** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 2020.

UNUGUL, T. et al. **Environmentally Friendly Processes from Coffee Wastes to Trimethylolpropane Esters to be Considered Biolubricants**. [s.l.] Taylor & Francis, 2020. v. 0

URRUTIA, P. et al. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 182–193, 2018.

VAHIDI, M. et al. An organic solvent-tolerant lipase of *Streptomyces pratensis* MV1 with the potential application for enzymatic improvement of n6/n3 ratio in polyunsaturated fatty acids from fenugreek seed oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 7, p. 2761–2772, 2021.

VALÉRIO, R. B. R. et al. Understanding the biocatalytic potential of lipase from *Rhizopus chinensis*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 4230–4260, 2022.

VARMA, R.; VASUDEVAN, S. Extraction, characterization, and antimicrobial activity of chitosan from horse mussel *Modiolus modiolus*. **ACS Omega**, v. 5, n. 32, 2020.

VERMA, M. L. et al. **Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications** *Environmental Chemistry Letters*, mar. 2020.

VERMA, R.; KUMAR, A.; KUMAR, S. Synthesis and characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of thermostable xylanase from *Geobacillus thermodenitrificans* X1. **Process Biochemistry**, v. 80, n. January, p. 72–79, 2019.

VERMA, S.; MEGHWANSHI, G. K.; KUMAR, R. **Current perspectives for microbial lipases from extremophiles and metagenomics** *Biochimie*, 2021.

VILAS BÔAS, R. N. et al. Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: Lipase screening, reactor system development, and reaction optimization. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 168, 2021.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical,

physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Lecitase ultra: A phospholipase with great potential in biocatalysis. **Molecular Catalysis**, v. 473, n. April, p. 110405, 2019.

WAFITI, N. S. A. et al. Immobilized lipase-catalyzed transesterification for synthesis of biolubricant from palm oil methyl ester and trimethylolpropane. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 11, p. 2429–2444, 2021.

WAHAB, R. A. et al. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, n. February, p. 104613, 2020.

WANCURA, J. H. C. et al. Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. **Journal of Cleaner Production**, v. 285, n. October 2018, 2021.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. **The antimicrobial activity of nanoparticles: Present situation and prospects for the future** *International Journal of Nanomedicine*, 2017.

WANG, S. et al. Preparation, activity and structure of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with nanoparticle. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 107, p. 22–31, 2017.

WANG, Y. et al. Oriented covalent immobilization of recombinant protein A on the glutaraldehyde activated agarose support. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 100–108, 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, 2016.

WITTMANN, C. et al. Part I Enabling and Improving Large-Scale Bio-production 1 Industrial-Scale Fermentation. 2017.

WU, L. et al. **Computer-aided understanding and engineering of enzymatic selectivity** *Biotechnology Advances*, 2022.

WU, X.; YANG, C.; GE, J. Green synthesis of enzyme/metal-organic framework composites with high stability in protein denaturing solvents. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 0–7, 2017.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, n. 7, p. 27–35, 2022.

XIE, M. et al. Natural wax from non-medicinal aerial part of *Codonopsis pilosula* as a biolubricant. **Journal of Cleaner Production**, v. 242, p. 118403, 2020.

XU, M. Q. et al. **Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts** *Catalysts*, 2018.

XU, M. Q. et al. Combined cross-linked enzyme aggregates of glycerol dehydrogenase and NADH oxidase for high efficiency in situ NAD⁺ regeneration. **International**

Journal of Biological Macromolecules, v. 144, p. 1013–1021, 2020.

XUE, J. et al. **Electrospinning and electrospun nanofibers: Methods, materials, and applications***Chemical Reviews*, 2019.

YAO, L. et al. Synthesis and physical properties of potential biolubricants based on ricinoleic acid. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, n. 8, p. 937–945, 2010.

ZAAK, H. et al. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 67–74, 2017.

ZDARTA, J. et al. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 24 fev. 2018.

ZHANG, D. H.; YUWEN, L. X.; PENG, L. J. **Parameters affecting the performance of immobilized enzyme***Journal of Chemistry*, 2013.

ZHANG, W. et al. Green preparation of branched biolubricant by chemically modifying waste cooking oil with lipase and ionic liquid. **Journal of Cleaner Production**, v. 274, p. 122918, 2020.

ZHOU, H. X.; PANG, X. **Electrostatic Interactions in Protein Structure, Folding, Binding, and Condensation***Chemical Reviews*, 2018.

ZHU, D.; WU, Q.; HUA, L. Industrial enzymes. **Comprehensive Biotechnology**, p. 1–13, 1 jan. 2019.

ZHU, Y. C. et al. Enzyme-based biosensors and their applications. In: **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Technology**. [s.l.: s.n.]. p. 201–223.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.

CAPÍTULO 3

*Um novo biocatalisador híbrido imobilizado da lipase
Eversa® Transform 2.0 e sua aplicação na síntese de
biolubrificantes*

3.1. RESUMO

Neste estudo, o método Taguchi foi utilizado para uma otimização experimental, na qual a lipase Eversa® Transform 2.0 (EVS) foi imobilizada em suporte híbrido formado por quitosana (CHI) e agarose (AGA) utilizando glutaraldeído (GA). O biocatalisador produzido foi caracterizado por Difração de Raios-X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), Espectroscopia de Dispersão de Energia (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As condições de reação otimizadas de 1 hora, força iônica de 5 mM, concentração de 1% de GA e carga de proteína de 5 mg por g de suporte resultaram em um biocatalisador mais ativo ($74,39 \pm 0,48$ U/g) e um rendimento de imobilização de $74,20 \pm 0,28\%$. O biocatalisador produzido perdeu apenas 15,3% de sua atividade após 61 dias de armazenamento, teve sua atividade aumentada em $96,70\% \pm 0,76$, $27,34\% \pm 2,34$ e $84,35\% \pm 1,68$ na presença dos solventes orgânicos hexano, ciclohexano e metanol, respectivamente, apresentou atividade mais significativa em temperaturas acima de 50°C e ainda reteve quase 30% de sua atividade total a 70°C. Atividade enzimática em pH alcalino, elevando a atividade da Transformada Eversa® 2.0 em até 140% em pH 9. O teste de dessorção não revelou desprendimento enzimático do suporte. O novo biocatalisador produzido apresentou características promissoras em ésteres lubrificantes. Além disso, o estudo in silico revelou uma afinidade de ligação de -5,1 kcal/mol entre o ácido oleico e a enzima, sugerindo que a combinação de substrato e lipase foi mais estável e adequada para esterificação.

Palavras-chave: Eversa®Transform 2.0. Imobilização enzimática. Quitosana. Agarose. Biolubrificantes. Estudos de docking.

3.2. INTRODUÇÃO

As enzimas são caracterizadas como macromoléculas biológicas que atuam como biocatalisadores muito versáteis devido às suas propriedades como quimio-, regio- e estereoespecificidade, bem como as moderadas condições de reação em que podem ser aplicadas, demonstrando a possibilidade de uso crescente em diversas áreas (BERING; THOMPSON; MICKLEFIELD, 2022; BORNSCHEUER, 2003; CAVALCANTE et al., 2021a; DA FONSECA et al., 2022; DROUT; ROBISON; FARHA, 2019; MONTEIRO et al., 2021a, 2021b; NAZOR; LIU; HUISMAN, 2021; VIRGEN-ORTÍZ et al., 2019; WU et al., 2022). São biodegradáveis, essencialmente atóxicas e não perigosas, evitando a contaminação ambiental por resíduos de catalisadores, além de terem disponibilidade e custos relativamente estáveis, pois são recursos renováveis baratos (CARNEIRO et al., 2020; DE OLIVEIRA et al., 2021a; SHELDON; BRADY, 2021; SHELDON; VAN PELT, 2013; SOUZA et al., 2022).

Dentre as classes de enzimas existentes, as lipases (EC 3.1.1.3) estão no grupo das hidrolases, que são enzimas capazes de catalisar a hidrólise e a síntese de triglicerídeos de cadeia longa em ácidos graxos, diacilglicerol, monoacilglicerol e glicerol, além de reações de interesterificação, esterificação, aminólise e alcoólise (CASAS-GODOY; DUQUESNE; BORDES, 2012; CHANDRA et al., 2020; DA S. MOREIRA et al., 2021; ELIAS et al., 2021; FERREIRA MOTA et al., 2022; GHASEMI et al., 2021; LIMA et al., 2021; ROCHA et al., 2020; SOUZA et al., 2020; VALÉRIO et al., 2022). A Eversa® Transform 2.0, recentemente introduzida pela Novozymes, é uma lipase líquida derivada de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificada e expressa em *Aspergillus oryzae*, com 269 resíduos de aminoácidos na sequência primária, apresentando baixo custo, alta especificidade para matérias-primas e alta atividade em condições suaves (BONAZZA et al., 2018; CHANG; CHAN; SONG, 2021; FRAGA et al., 2019; MONTEIRO et al., 2021a).

Apesar de seu grande potencial, as aplicações industriais de sua forma livre foram prejudicadas principalmente devido a algumas limitações como instabilidade e baixa eficiência catalítica (CHOI; HAN; KIM, 2015; ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021). Diferentes abordagens foram testadas para superar essas deficiências, incluindo processos de imobilização, que permitem a recuperação e proporcionam uma estabilidade mais excelente, tornando as enzimas mais robustas e resistentes a reações sob condições mais severas (CAO, 2005; CAVALCANTE et al., 2021c; CHOI; HAN; KIM, 2015;

FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; NERY; KUBOTA, 2016). Assim, algumas técnicas de imobilização com diferentes desvantagens e vantagens, dependendo da reação e da enzima, foram descritas, sendo categorizadas em aprisionamento, adsorção, reticulação e ligação covalente (AGHAEI; YASINIAN; TAGHIZADEH, 2021; BICKERSTAFF, 2003; FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2015; REIS et al., 2019b).

O método de ligação covalente é um dos mais utilizados, pois proporciona uma forte ligação entre os grupos tiol e amina da enzima e os grupos ativos do suporte, evitando perdas por lixiviação e aumentando a estabilidade térmica e operacional da enzima (BEZERRA et al., 2020b; DE SOUZA et al., 2020b; MONTEIRO et al., 2019b; UGWUODO; NWAGU, 2020). Em geral, para que essas reações ocorram, a superfície do suporte deve ser modificada ou funcionalizada e, neste caso, o glutaraldeído é o reagente mais utilizado, atuando como ativador de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade do seu uso e à alta estabilidade da ligação amino-glutaraldeído que é gerada (FERREIRA GONÇALVES et al., 2021; MOREIRA et al., 2020; URRUTIA et al., 2018; WANG et al., 2018).

O tipo de suporte utilizado é outro fator de impacto significativo na imobilização enzimática (WAHAB et al., 2020; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016). Suas características desejáveis neste processo são o baixo custo, a não toxicidade, além de não afetar negativamente a atividade enzimática (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2015; MORTAZAVI; AGHAEI, 2020). Além disso, outros aspectos essenciais são área de superfície, tamanho de partícula, carga superficial, hidrofobicidade e hidrofilicidade, funcionalização da superfície, estabilidade química, mecânica e porosidade do material (LIU et al., 2021; RIOS et al., 2019a; XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022).

A quitosana aparece como o segundo biopolímero mais abundante e um dos materiais de suporte mais utilizados para imobilizações enzimáticas devido ao seu baixo custo, disponibilidade, biodegradabilidade, biocompatibilidade e hidrofilicidade, propriedades de adsorção e capacidade de desenvolver filmes e quelatos de íons metálicos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013; NUNES et al., 2021; POURMADADI et al., 2021; VERMA et al., 2020; XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022). A agarose, por outro lado, é um polímero heteropolissacarídeo linear, capaz de fornecer um microambiente eficiente para uma reação enzima-substrato, além de facilitar a liberação de produtos no meio reacional e ter uma tremenda capacidade gelificante em temperaturas abaixo de 35° C com a adição de quaisquer íons, resultando no desenvolvimento de estruturas

estabilizadas e rígidas (SAEEDI GARAKANI et al., 2020; ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016).

A produção de biolubrificantes catalisados por enzimas demonstra propriedades promissoras, como condições de reação suaves, configurações de reatores altamente seletivas que simplificam a integração do processo, maior eficiência energética e redução de resíduos do que as rotas convencionais (BARBOSA et al., 2021; UNUGUL et al., 2020). As lipases foram escolhidas para este processo devido à sua alta estabilidade e capacidade de converter vários substratos (AGUIEIRAS et al., 2020; FERNANDES et al., 2021). Biolubrificantes são ésteres de ácidos graxos derivados de óleos vegetais, utilizados como alternativas sustentáveis aos lubrificantes de óleos minerais, pois possuem propriedades biodegradáveis e não tóxicas e garantem fácil descarte no meio ambiente (ATTIA et al., 2020; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021; HEIKAL et al., 2017; KIM et al., 2019).

Portanto, este trabalho teve como objetivo imobilizar a lipase Eversa® Transform 2.0, via ligação covalente em suporte híbrido composto de quitosana e agarose ativada com glutaraldeído para desenvolver um novo biocatalisador a partir da otimização experimental pelo método de Taguchi. Ressalta-se que não há registros na literatura científica sobre a estratégia adotada neste estudo com esta lipase sendo relatada aqui pela primeira vez, até onde sabemos. O biocatalisador produzido foi caracterizado por análises instrumentais (XRD, FTIR, SEM, TGA e EDS) e avaliado quanto ao seu comportamento em diferentes solventes, pH's, temperaturas e síntese de biolubrificantes. Além disso, o docking molecular foi usado para esclarecer detalhes da reação da lipase. Estudos de docagem molecular comparam as atividades biológicas de moléculas com enzimas (TASLIMI et al., 2021). Esta técnica computacional permite a investigação de estruturas e as possíveis orientações que uma determinada molécula pode tomar dentro do sítio de ligação de um biorreceptor ou entre duas macromoléculas (DA S. MOREIRA et al., 2021; FONSECA et al., 2020; TAHA et al., 2015).

O uso do desenho experimental para otimização de processos tem a vantagem de reduzir o número de execuções experimentais, consequentemente resultando em menor uso de produtos químicos e matérias-primas (ALAFAGHANI; QATTAWI, 2018; KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018). Assim, o método Taguchi é eficiente, projetando parâmetros de processamento com um número mínimo de experimentos, pois opera sistematicamente com menos tentativas, reduzindo tempo, custo e esforço (ABIFARIN; PRAKASH; SINGH, 2021). Ele emprega um projeto fatorial fracionário na

forma de uma matriz ortogonal que inclui representantes de todas as combinações possíveis de parâmetros experimentais selecionados, o que pode aumentar a eficiência e a precisão enquanto reduz quaisquer erros experimentais (CHENTHAMARAKSHAN et al., 2017).

3.3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1. Materiais

A lipase comercial Eversa® transform 2.0 de *Aspergillus oryzae* foi adquirida da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (Cotia, São Paulo, Brasil). O Pó de quitosana, agarose em pó, solução glutaraldeído de grau II, p-nitrofenil butirato (p-NPB) e o Triton X-100 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Cotia, São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes químicos usados eram de grau analítico de Synth (São Paulo, Brasil) e Vetec (São Paulo, Brasil). O software Statistica® 10 (Statsoft, EUA), foi utilizado para o desenvolvimento do planejamento experimental a partir do método Taguchi.

3.3.2. Métodos

3.3.3. Preparação do suporte híbrido de quitosana/agarose

O gel híbrido de quitosana/agarose (QUI-AGA) (5% m/v) foi preparado segundo a metodologia descrita por (CARNEIRO et al., 2020) com algumas modificações. Primeiramente, foram dissolvidos 2,5 g de agarose juntamente com 2,5g de quitosana em uma solução de ácido acético a 5% e mantido sob agitação durante 30 minutos. Em seguida, esta solução foi inserida lentamente, com o auxílio de uma seringa, em 4 L de NaOH 0,1 M (v/v) e mantida sob baixa agitação mecânica durante a noite a uma temperatura de 25 °C (OKURA et al., 2020). Por fim, o suporte foi filtrado e lavado com água destilada até atingir a neutralidade, que foi verificada através da fenolftaleína (PINHEIRO et al., 2019a).

3.3.4. Ativação do suporte com Glutaraldeído (GLU)

Para a construção das ligações covalentes entre suporte e enzima, o híbrido de quitosana/agarose foi ativado em três concentrações diferentes de glutaraldeído (CHI-AGA-GLU), utilizando-se a metodologia descrita por (DOS SANTOS et al., 2015), com algumas modificações. Primeiramente, 1,0 g de suporte seco foi colocado na presença de uma solução de 10 ml de tampão de fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0 contendo 1%, 5% ou 9% (v/v) de glutaraldeído, a uma temperatura de 25 °C, por 2 h (PINHEIRO et al.,

2019a). O suporte ativado foi filtrado em um funil de Buchner sob vácuo usando papel de filtro e lavado com água destilada para retirar o excesso de glutaraldeído (OKURA et al., 2020).

3.3.5. Projeto experimental para a imobilização da Eversa® Transform 2.0

No presente estudo, foi realizado um projeto experimental avançado através do método Taguchi que tem um padrão ortogonal L9 matriz, em que “L” representa o quadrado latino e “9” o número de experimentos. Ele foi usado para investigar quatro fatores (tempo, força iônica, concentração de glutaraldeído e carga de proteína) em três níveis, com a finalidade de otimizar a imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 em quitosana/agarose, pelo método multicomponente o. Para isso, 0,1 g de QUI-AGA-GLU (1, 5 e 9%) foi suspenso em 1 mL de tampão pH 7 com variação na força iônica (5, 100 e 195 mM), contendo uma carga de proteína Eversa® Transform 2.0 (carga de enzima: 1, 5 e 9 mg/g de suporte), na presença de 0,01% de Triton X-100. O sistema foi mantido sob agitação moderada constante durante 1–7 h a 25 °C. Por fim, a lipase imobilizada foi separada por decantação, lavada com excesso de água destilada até a neutralidade, seca sob vácuo e armazenada a uma temperatura de 5 °C (DA S. MOREIRA et al., 2021; PINHEIRO et al., 2019a).

O delineamento experimental e análise estatística foram realizados a partir do software Statistica® 10 (Statsoft, EUA). A tabela 2 apresenta os fatores independentes que foram utilizados no planejamento e a tabela 3, apresentada nos resultados, mostra o desenho experimental, o resultado do biocatalisador valor da atividade e as relações S/N (sinal-ruído).

Tabela 2 - Tabela 1 - Fatores independentes e seus respectivos níveis para a imobilização EVS - QUI/AGA/GLU.

	Tempo (H)	Força iônica (mM)	Concentração de GLU (%)	Carga de proteína (mg/g)
Nível 1 (L1)	1	5	1	1
Nível 2 (L2)	4	100	5	5
Nível 3 (L3)	7	195	9	9

Fonte: Autora.

Para calcular os valores das relações S/R que correspondem aos valores da atividade do biocatalisador, a função "maior é melhor" é usada uma vez que o objetivo do estudo é maximizar a resposta variável (atividade do biocatalisador). O cálculo das relações S/N para cada experimento, foi feito a partir da Equação (1).

$$\frac{S}{N} = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (1)$$

Em que, y é a atividade do biocatalisador para o experimento correspondente, i é o número de repetições n é o número de respostas para a combinação de níveis de fator em qualquer combinação paramétrica específica de acordo com a Tabela 1. A relação S/R prevista em condições ótimas para o processo de obtenção da atividade do biocatalisador foi estimada pela Equação (2) (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$\frac{S}{N_{\text{previsto}}} = \frac{\bar{S}}{N} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{N_j} - \frac{\bar{S}}{N} \right) \quad (2)$$

Em que, \bar{S}/N é a média aritmética de todas as razões S/N, S/N_j é a razão S/N no ponto ótimo para cada fator n é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

3.3.6. Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína

A atividade da lipase solúvel e imobilizada foi determinada conforme a metodologia descrita por (RIOS et al., 2016). A leitura da atividade foi realizada através da hidrólise de *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB 50 mM em acetonitrila), como um substrato pelo tempo de 90 s, sob agitação magnética; a concentração de *p*-nitrofenil butirato foi quantificado espectrofotometricamente através do aumento da absorbância a 348 nm. Medidas de atividade foram realizadas em solução tampão de fosfato de sódio pH 7 (25 mM) a 25 °C (nessas condições é $5150 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (BEZERRA et al., 2020b; DA S. MOREIRA et al., 2021; PINHEIRO et al., 2019a). Para isso 50 μL de a solução de lipase suspensa foi adicionada à 50 μL de *p*-NPB e 2,5 mL da solução tampão. Nessas condições, uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 mol de *p*-NPB por minuto. A concentração de proteína foi determinada usando o método Bradford (1976) descrito, e albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976).

3.3.7. Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram determinados de acordo com à metodologia descrita por (PINHEIRO et al., 2019a), com a finalidade de analisar o desempenho da estratégia de imobilização. O rendimento de imobilização (IY) foi

definido como a porcentagem de atividade enzimática presente no sobrenadante antes e depois de um determinado período. A atividade (AtT) da enzima imobilizada foi calculada usando o rendimento de imobilização (IY) e a carga de proteína oferecida por g de suporte (BEZERRA et al., 2020b). Já a atividade recuperada (AtR) foi determinada como o relação entre a atividade do biocatalisador (AtD) e a atividade teórica (AtT) (CARNEIRO et al., 2020; DA S. MOREIRA et al., 2021; PINHEIRO et al., 2019b).

3.3.8. Capacidade de carga do suporte na imobilização da lipase

A capacidade de carga do suporte para a imobilização da Eversa® Transform 2.0 foi investigada através da suspensão de 10 mg de QUI-AGA em 1 mL de solução tampão de carbonato de sódio (5 mM e pH 7) contendo a lipase (carga de enzima: 1, 9, 13, 15, 23, 31, 40 e 50 mg de enzima por g de suporte). Esse sistema foi mantido sob agitação constante por 1 h a 25 °C e posteriormente foram realizadas as medidas de atividade.

3.3.9. Estabilidade de armazenamento da lipase imobilizada

Para avaliar a estabilidade de armazenamento do biocatalisador QUI-AGA-EVERSA, as enzimas imobilizadas, secas na estufa a 30 °C durante 24 h e posteriormente, armazenadas a 4°C, foram utilizadas, sendo suas atividades determinadas periodicamente. Para isso, uma carga de 5 mg de proteína/g de suporte foi oferecida, e as leituras da atividade enzimática foram feitas em um intervalo de 61 dias. O processo foi realizado utilizando-se 10 mg do biocatalisador adicionados a 2,5 ml de 25 mM de tampão fosfato de sódio em pH 7,0 para determinação da atividade.

3.3.10. Efeito do pH na lipase solúvel e imobilizada

Para avaliar o efeito do pH sobre as enzimas solúvel e imobilizada, estas foram incubadas por 15 minutos em 1 mL de diferentes tampões (pH 4-9, 5 mM). Para a leitura da atividade, o *p*-NPB foi usado, conforme descrito anteriormente, usando tampões com o pH variando de 4 a 9 (acetato de sódio, sódio fosfato ou carbonato de sódio).

3.3.11. Efeito da temperatura de reação na atividade da enzima livre e imobilizada

A atividade hidrolítica da enzima livre e imobilizada foi avaliada em diferentes temperaturas conforme a metodologia de (MELO et al., 2017), com modificações. Para isso, EVS e CHI/AGA/GLU/EVS foram incubadas em tampão carbonato sódio (5 mM;

pH 7) a 25,30,40,50, 60, 70 e 80 °C durante 10 min. A atividade foi medida usando *p*-NPB, e a atividade residual foi expressa como uma porcentagem da atividade inicial.

3.3.12. Atividade em solventes orgânicos

A atividade do biocatalisador foi avaliada em diferentes misturas de solventes orgânicos (hexano 25%; ciclohexano 25%, metanol 25% e tampão fosfato pH 7,0), de acordo com a seguinte metodologia: 1,0 mL do solvente avaliado e 50 µL de *p*-NPB, foram adicionados em 10mg do biocatalisador.

3.3.13. Testes de dessorção do biocatalisador

Para avaliar a interação entre a lipase e o suporte QUI/AGA/GLU, 0,1 g do biocatalisador foi suspenso em 1 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7, NaCl 1M ou 0,1% (v/v) de Triton X-100 e mantido sob agitação moderada. Após o tempo de 30 e 60 min, foi realizada a medida de atividade do sobrenadante.

3.3.14. Caracterização de materiais

Para os espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi utilizado um espectrofotômetro Perkin-Elmer 2000 com varredura de 4000 a 400 cm⁻¹. Para a obtenção dos pellets, as amostras foram previamente secas para remoção da absorção de água e dispersas em KBr na proporção de 1:10. Posteriormente, eles foram moldados com prensa hidráulica.

A difração de raios X (DRX) foi medida à temperatura ambiente, em difratômetro Bruker (D8 Advance), com tubo CuK α ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$), equipado com um detector linear LynxEye: voltagem de 40 kV e corrente de 40 mA a faixa de varredura $2\theta = 5 - 80^\circ$ e uma etapa de 0,02.

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada da temperatura ambiente até 900 ° C, com taxa de aquecimento de 10°C/min em atmosfera de N₂ com fluxo de 50 mL/min. Foi utilizado um equipamento Perkin Elmer, modelo STA 6000 Simultaneous Thermal Analyze.

Imagens de MEV e o mapa elementar por EDS foram realizados para avaliação da morfologia e composição química. As imagens obtidas da superfície dos materiais foram de um microscópio QUANTA 450 FEG (FEI, Amsterdam, Holanda) com EDS. As amostras foram recobertas por prata metálica utilizando o equipamento de metalização Quorum QT150ES aplicando um feixe de elétrons incidente com 20 kV.

3.3.15. Produção enzimática de ésteres de 2-etil-1-hexanol via esterificação

A síntese dos ésteres foi realizada em frasco de 5 ml em incubadora orbital shaker a 250 rpm. A esterificação foi realizada utilizando como substratos ácido oleico e 2-etil-1-hexanol na proporção 1:1 ácido/álcool (VILAS BÔAS et al., 2021). A reação começou com a adição de 5% de Eversa® Transform 2.0 incubado a 55°C por 6h. Após o término da reação, foram realizados testes para medir o índice de acidez do sobrenadante e determinar o grau de conversão da biocatálise (MONTEIRO et al., 2019a). Para isso, foram retiradas duas alíquotas de 0,3 g do meio reacional, diluídas em 7,5 ml de álcool etílico neutralizado e adicionadas 3 gotas de fenolftaleína. Em seguida, as amostras foram tituladas com hidróxido de sódio (0,1 M). A estimativa do índice de acidez foi determinada utilizando a Equação (1) como parâmetro (CAVALCANTI et al., 2018).

$$\text{Conversion (\%)} = \frac{IA_i - IA_f}{IA_i} \times 100 \quad (3)$$

IA_i corresponde ao índice de acidez inicial, a quantidade de AGL adicionado na reação, e IA_f ao índice de acidez final, equivalente ao que resta de AGL em solução, não utilizado pela enzima.

3.3.16. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) unidimensional foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Avance DRX-500 operando na frequência do hidrogênio a 500 MHz. Os equipamentos são pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC).

3.3.17. Docking Molecular

3.3.18. Modelagem de homologia

Inicialmente foi realizada a modelagem comparativa da proteína lipase Eversa® Transform 2.0, que envolveu quatro etapas.

3.3.19. Identificação e seleção da proteína modelo

A sequência de aminoácidos da proteína Eversa lipase, foi submetida a uma análise comparativa através do programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (www.ncbi.nih.gov/BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990) e em sua base de dados PDB. Assim, uma proteína relacionada à sequência de aminoácidos, a enzima lipase,

classificada como hidrolase, foi identificada pelo organismo *Aspergillus oryzae*, expressa através da lançadeira *Escherichia coli-Pichia pastoris*, obtida do Banco de dados de proteínas (<https://www.rcsb.org/>) com o código 5XK2 sendo a proteína alvo.

3.3.20. Alinhamento de sequências de alvo e molde

O alinhamento entre as sequências foi realizado utilizando o programa Modeller (<http://www.salilab.org/modeller/>) (WEBB; SALI, 2016).

3.3.21. Construção e otimização de modelos

A construção do modelo também foi realizada pelo programa Modeller (WEBB; SALI, 2016), obtendo assim uma nova proteína chamada Eversa® Transform 2.0, avaliada de acordo com a função objetivo e parâmetros estereoquímicos (BEDOYA; TISCHER, 2015).

3.3.22. Validação de proteínas

A validação do modelo foi realizada nos níveis estereoquímico, conformacional e energético. A qualidade do modelo gerado foi validada pelo gráfico de Ramachandran (RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN C.; SASISEKHARAN, 1963) com o programa PROCHECK (<https://saves.mbi.ucla.edu/>), que avaliou sua estrutura tridimensional, indicando a possível qualidade estereoquímica (LASKOWSKI et al., 1993).

3.3.23. Preparação de proteína

A proteína criada pela homologia Eversa® Transform 2.0 foi submetida a um processo de correção de cargas e adição de átomos de hidrogênio através do Programa AutoDock Tools (MORRIS et al., 2009).

3.3.24. Obtenção do ligante

A estruturação do ácido oleico foi realizada no software ChemDraw 3D e posteriormente minimizada com o auxílio de um campo de força MM2 com gradiente RMS de 0,0001. Para fins de otimização estrutural, a configuração foi realizada através do Software Avogadro® (HANWELL et al., 2012), a configuração com o Merk Molecular Force Field (MMFF94), com ciclos de 500 interações e um algoritmo mais íngreme, tendo o limite de convergência de $10e^{-7}$ (HALGREN, 1996) e posteriormente convertido para o formato pdbqt.

3.3.25. Docking molecular e visualização de cálculos

A simulação de acoplamento molecular foi realizada com o código AutoDockVina (TROTT; OLSON, 2009), considerando proteínas rígidas e ligantes flexíveis. Uma configuração de grade foi realizada com o sítio ativo da enzima (BEN HLIMA et al., 2021; CEN et al., 2019). Os perfis de energia das interações ligante-receptor também foram avaliados por software, e a visualização das poses ancoradas foi feita pelo ChimeraX (PETTERSEN et al., 2021).

Para encontrar locais de conexão de imobilização, o CASTp 3.0 foi usado para identificar e medir bolsões de superfície alcançáveis (TIAN et al., 2018). Alguns critérios devem ser atendidos para que a imobilização selecionada seja aceita: o sítio deve estar distante do centro catalítico ativo da enzima para não afetar a atividade catalítica; o tamanho do sítio/bolso deve ser grande o suficiente para acomodar o link de afinidade selecionado; e finalmente, as propriedades de superfície da região do sítio precisam ser significativamente diferentes daquelas do sítio ativo.

3.4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. Otimização da imobilização da *Eversa Transform 2.0* no suporte híbrido QUI/AGA

Através do método Taguchi foram obtidas as combinações dos fatores independentes em seus respectivos níveis, os valores do fator dependente (que é a atividade do biocatalisador) e a razão S/R para o projeto experimental de matriz ortogonal L9. Esses dados podem ser observados na tabela 3. A relação S/R foi determinada pela função "maior é melhor", com o objetivo de maximizar a atividade QUI/AGA/GLU/EVS.

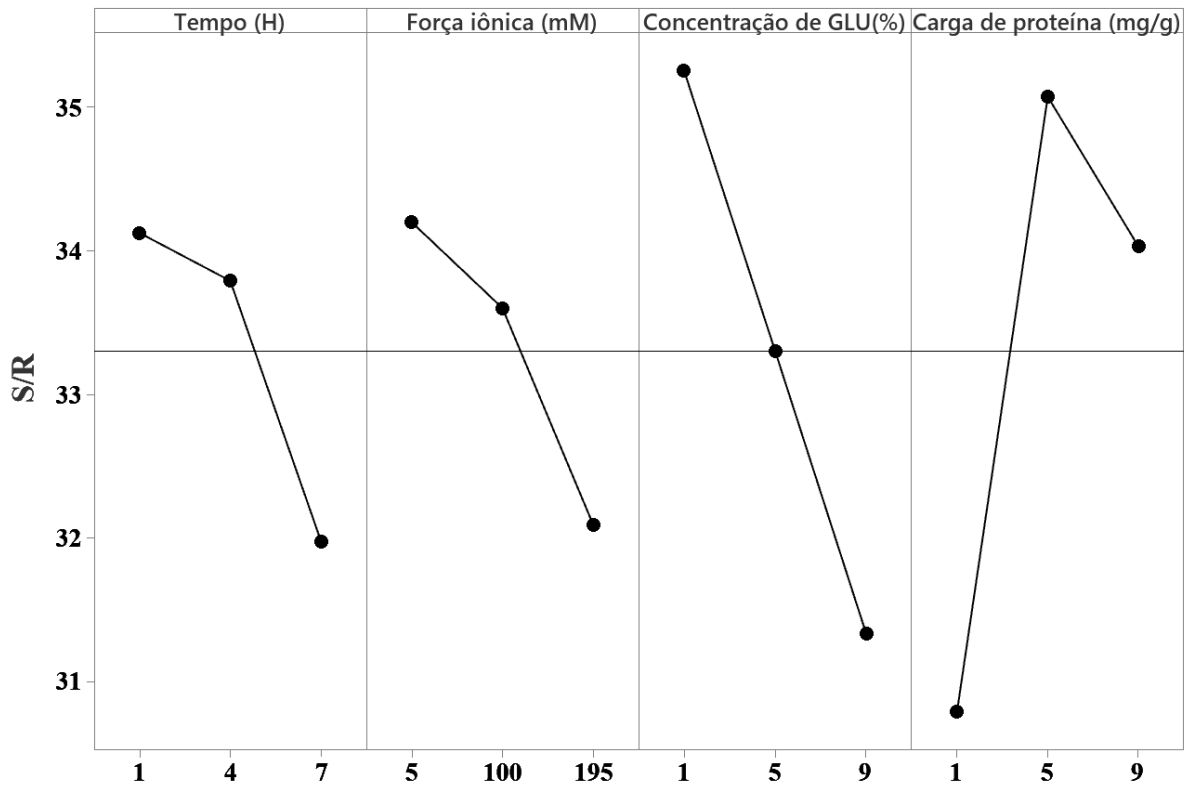
Tabela 3 - Desenho de matriz ortogonal L9 junto com os valores de atividade QUI/AGA/GLU/EVS e as razões S/N.

Experimento	Tempo (H)	Força iônica (mM)	Concentração de Glu (%)	Carga de Proteína (mg)	Atividade do biocatalisador (U/g)	S/R
1	1	5	1	1	52,94 ± 0,76	34,47
2	1	100	5	5	64,62 ± 0,10	36,21
3	1	195	9	9	38,42 ± 0,37	31,70
4	4	5	5	9	59,08 ± 1,42	35,43
5	4	100	9	1	30,30 ± 0,12	29,63
6	4	195	1	5	65,44 ± 0,42	36,32
7	7	5	9	5	43,12 ± 1,17	32,70
8	7	100	1	9	56,04 ± 0,69	34,97
9	7	195	5	1	25,93 ± 0,38	28,27

Fonte: autora.

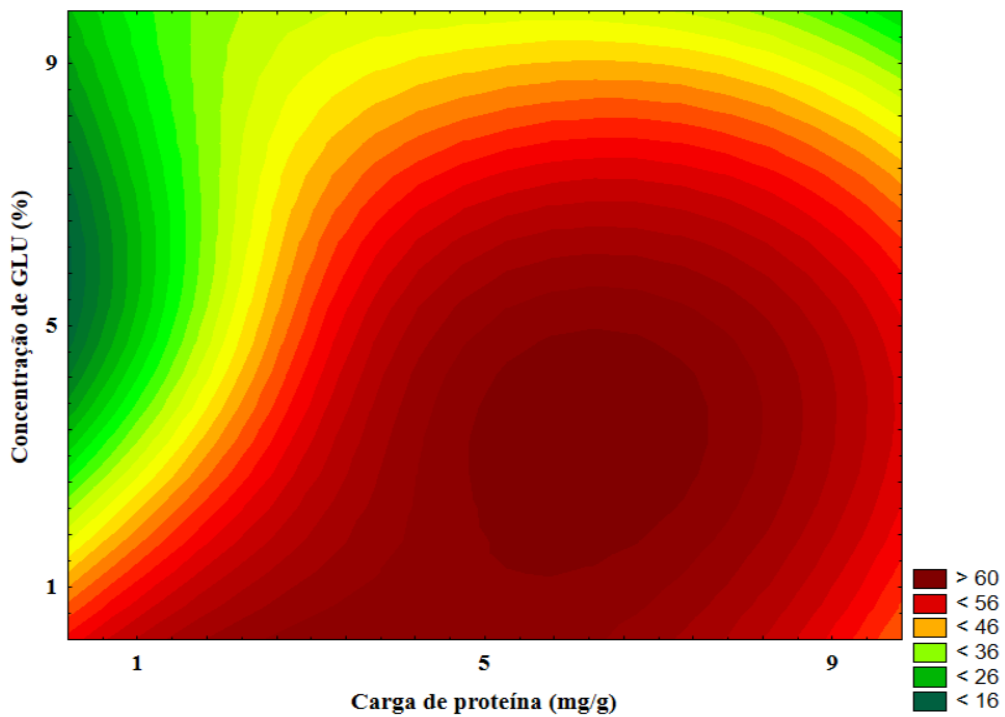
A relação S/R sugere qual o nível mais adequado para cada parâmetro resultando em um biocatalisador com maior atividade. A relação S/R ótima prevista para as condições otimizadas foi calculada a partir da Equação 2 Neste trabalho, a maior relação S/R obtida foi 38,75 determinando um ponto de máxima atividade de QUI/AGA/GLU/EVS onde os melhores níveis para cada parâmetro foram L1 (1 H) para tempo, L1 (5 mM) para força iônica, L1 (1%) para concentração de glutaraldeído e L2 (5mg) para carga de proteína como pode ser visto na Figura 8 e na Figura 9 de superfície de contorno; para esta combinação de parâmetros, a atividade teórica do QUI/AGA/GLU/EVS foi 74,28 U/g.

Figura 8 - A relação S/N representa o tempo, força iônica, pH e proteína de carga para otimização da imobilização CALA-CALB-QUI.



Fonte: Autora.

Figura 9 - Superfície de contorno para a imobilização de QUI/AGA/GLU/EVS, demonstrando carga de proteína (mg/g) versus concentração de GLU (%), levando em consideração a atividade do biocatalisador como resposta.



Fonte: Autora.

Em condições otimizadas (1h, 5 mM, concentração de glutaraldeído 1% e carga de proteína 5mg/g, o rendimento de imobilização (RI) foi de $74,20 \pm 0,28\%$ e a atividade experimental confirmada do QUI/AGA/GLU/EVS foi de $74,39 \pm 0,48$ U/g, enquanto a atividade de recuperação (AtR) foi de $27,75 \pm 0,14\%$ para uma atividade teórica (AtT) de $268,47 \pm 2,56$ U / g. De acordo com o método experimental, a carga de proteína foi o fator que mais influenciou na imobilização da Eversa® Transform 2.0 no suporte QUI/AGA, como pode ser visto na Tabela 4. A classificação dos parâmetros (Tempo, força iônica, concentração de GLU e carga de proteína) com base nos valores delta (a diferença dos valores da razão S/R entre os níveis mais altos e mais baixos dos fatores de processo) é mostrada na Tabela 4.

Tabela 4 - Tabela de resposta das relações S/R.

Nível	Tempo (H)	Concentração de Tampão (mM)	Concentração de GLU (%)	Carga de Proteína (mg/g)
1	34,12	34,20	35,25	30,79
2	33,79	33,60	33,30	35,07
3	31,98	32,09	31,34	34,03
Delta	2,14	2,10	3,92	4,28
Rank	3	4	2	1

Fonte: Autora.

Sabe-se que quitosana e agarose têm a característica de serem suportes hidrofóbicos. Normalmente, o sítio ativo do Eversa® Transform 2.0 é coberto por uma “tampa” (uma alça de peptídeo anfifílico), portanto ela funciona por meio de ativação interfacial (SUN; GUO; CHEN, 2021). Dessa forma, em baixa força iônica, como 5 mM que foi considerada a melhor para a imobilização de EVS em QUI/AGA, a ligação covalente entre lipases e suportes hidrofóbicos pode promover a imobilização e estabilização da estrutura aberta das lipases covalentes (RODRIGUES et al., 2019). Em forças iônicas elevadas, como 100 e 195 mM utilizadas nesse estudo, a conformação aberta da lipase ficaria em desvantagem, o que tornaria difícil imobilizar as lipases em quitosana via ligação (DA S. MOREIRA et al., 2021) . Logo, a imobilização de EVS em QUI/AGA foi realizada principalmente por troca iônica e ativação interfacial.

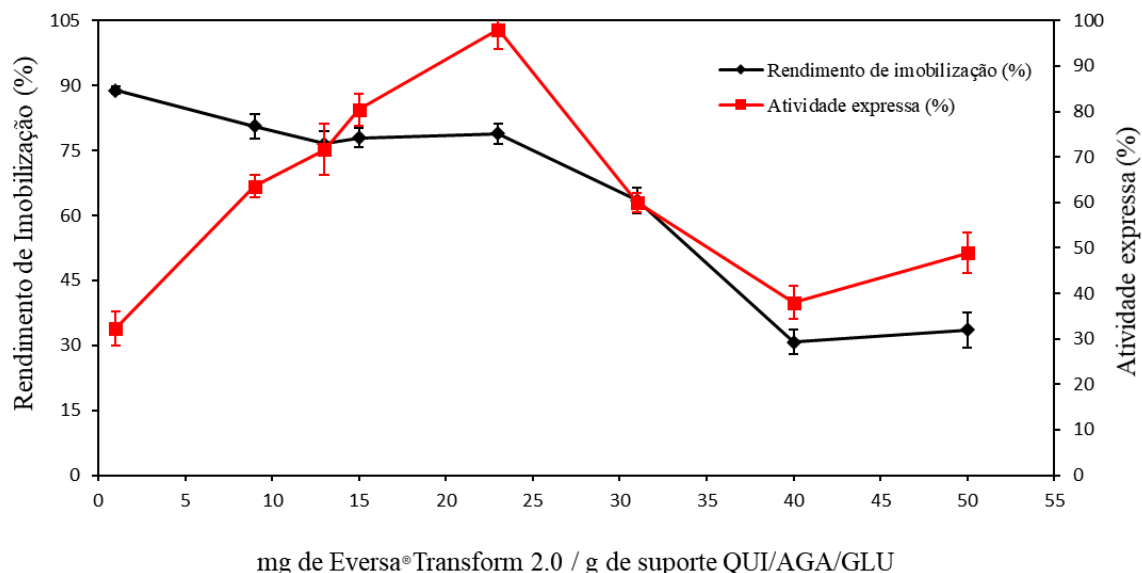
No estudo de Gur et al. 2018, eles comprovaram que uma concentração de glutaraldeído de 0,25% foi considerada ideal ao avaliar o rendimento da imobilização e a atividade relativa do biocatalisador (GÜR; İDİL; AKSÖZ, 2018). Em outro trabalho realizado por Oliveira et al. 2018, concentrações aumentadas de glutaraldeído na ativação de suporte produziram biocatalisadores com menor atividade do que aqueles obtidos

quando a concentração de glutaraldeído foi de 0,6% e 1,5%. Tal diminuição pode acontecer devido a alguma distorção na estrutura terciária da enzima causada pela forte interação entre a enzima e o suporte usado, ou pela ligação do glutaraldeído com diferentes grupos na superfície da enzima (DE OLIVEIRA et al., 2018). Ranjbari et al. 2019, relataram que uma ótima atividade do biocatalisador foi encontrada com glutaraldeído a 1%, onde 100% da enzima foi imobilizada, confirmando que a ativação do suporte usado com glutaraldeído foi eficiente (RANJBARI et al., 2019). Isso explica o fato de que a concentração ideal obtida nesse estudo para ativação do suporte QUI/AGA com glutaraldeído foi de 1% (v/v) evitando, dessa forma, a redução de atividade do biocatalisador produzido.

3.4.2. Capacidade de carga do suporte para imobilização da lipase e capacidade de armazenamento do biocatalisador produzido

Para aproveitar ao máximo os polímeros quitosana e agarose como suporte, a carga máxima de enzima oferecida foi analisada através de um teste de carga completa. Para isso, a Figura 10 apresenta o rendimento de imobilização e a atividade do biocatalisador em diferentes carregamentos de Eversa® Transfom 2.0 (1 - 50mg de EVS por grama de QUI/AGA). Nesse sentido, o maior rendimento de imobilização ($88,88\% \pm 0,36$) foi alcançado para 1:1 mg/g, enquanto diminuiu com o aumento da carga de EVS no suporte, exceto para 15 e 23 mg/g, este último sendo o ponto de maior atividade atingida pelo biocatalisador.

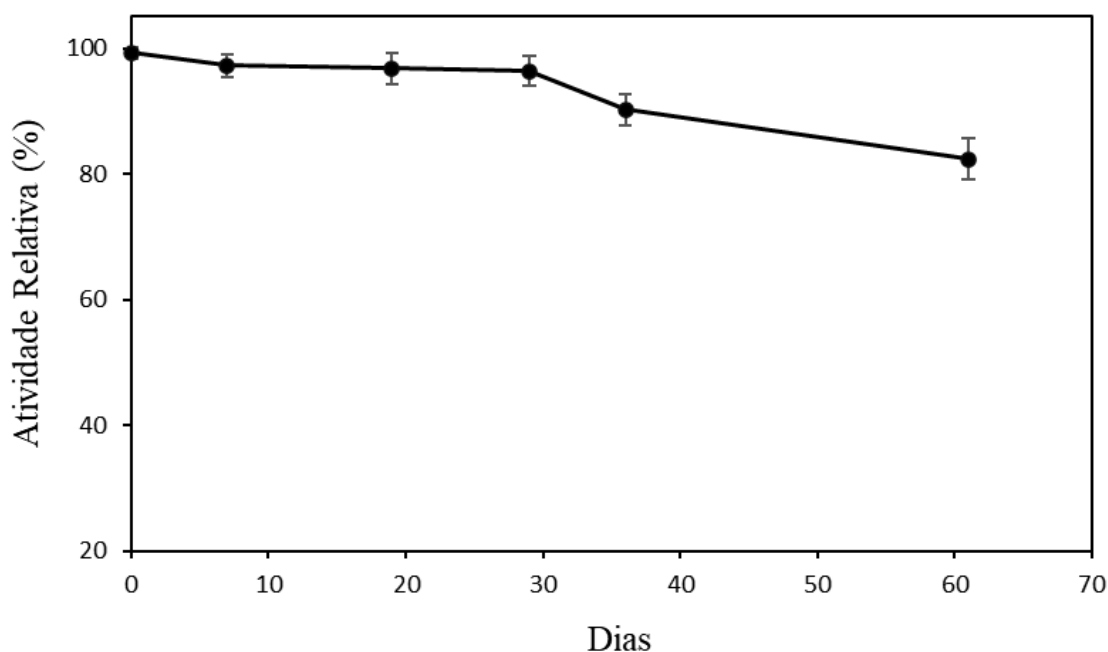
Figura 10 - Teste de capacidade de carga do suporte QUI/AGA para a lipase em 5mM, Concentração de GLU 1%, carga de proteína 1-50mg/g durante 1h.



Fonte: Autora.

O oferecimento de cargas elevadas de proteína pode ter aumentado a difusão do substrato, diminuindo o valor da atividade do biocatalisador (DA S. MOREIRA et al., 2021; RIOS et al., 2019b). Cargas elevadas podem causar interações entre as próprias moléculas de enzima, formando conglomerados e inibindo o alongamento flexível da conformação enzimática, resultando em deficiência estérica e inativação enzimática (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013). Para saber se o biocatalisador produzido neste estudo seria capaz de manter sua atividade catalítica ao longo do tempo, realizou-se o estudo da estabilidade de armazenamento. A Figura 11, apresenta a evolução da atividade do biocatalisador por 61 dias e mostra uma perda de apenas 15,3% de sua atividade catalítica.

Figura 11 - Estabilidade de QUI/AGA/GLU/EVS em armazenamento durante 61 dias, sob 4°C.

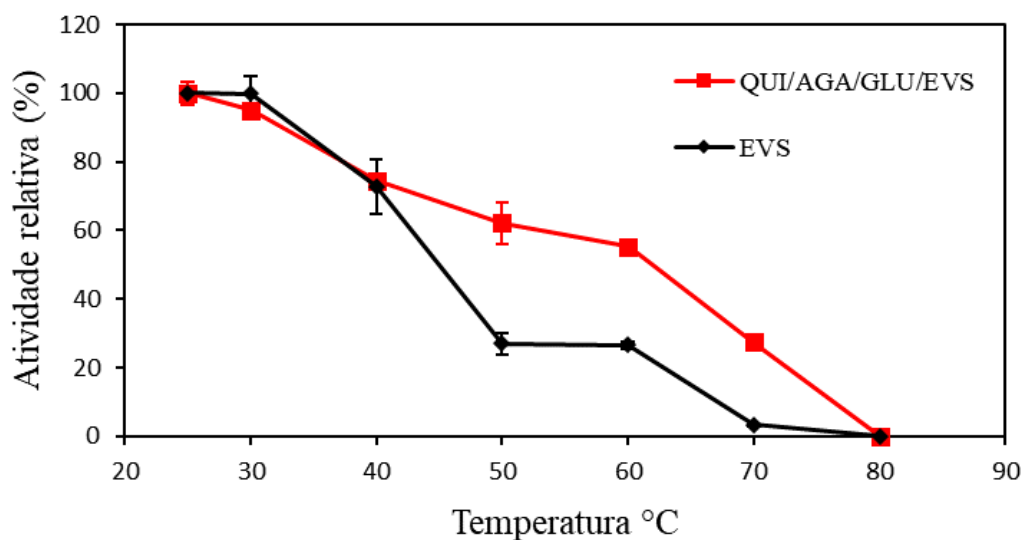


Fonte: Autora.

3.4.3. Estabilidade térmica e de pH

Depois da imobilização, a estrutura da lipase pode ser alterada, o que alteraria a acessibilidade do sítio ativo, a estabilidade e a especificidade. Dessa forma, torna-se importante investigar a influência do pH e da temperatura na atividade entre enzimas livres e imobilizadas (MO; QIU, 2020). No presente estudo, foi possível perceber que tanto a enzima solúvel, quanto a enzima imobilizada apresentaram suas atividades mais elevadas em temperaturas de 30 e 40°C, fato este que é confirmado em outros trabalhos (MIRANDA et al., 2020). Entretanto, a enzima solúvel teve uma diminuição brusca da sua atividade em temperaturas mais elevadas a partir de 40°C. Percebe-se através da Figura 12, que a imobilização contribuiu para o aumento da estabilidade térmica da lipase, uma vez que em temperaturas acima de 50°C ela apresentou uma atividade maior que sua forma solúvel. Outro fato concluído é que em 70°C o biocatalisador QUI/AGA/GLU/EVERSA ainda revete quase 30% da sua atividade inicial, enquanto a enzima livre praticamente não teve mais atividade significativa. Esse aumento de resistência na temperatura após a imobilização pode estar relacionado com o aumento da rigidez da enzima imobilizada (NWAGU; OKOLO; AOYAGI, 2021; SAHIN; OZMEN, 2020).

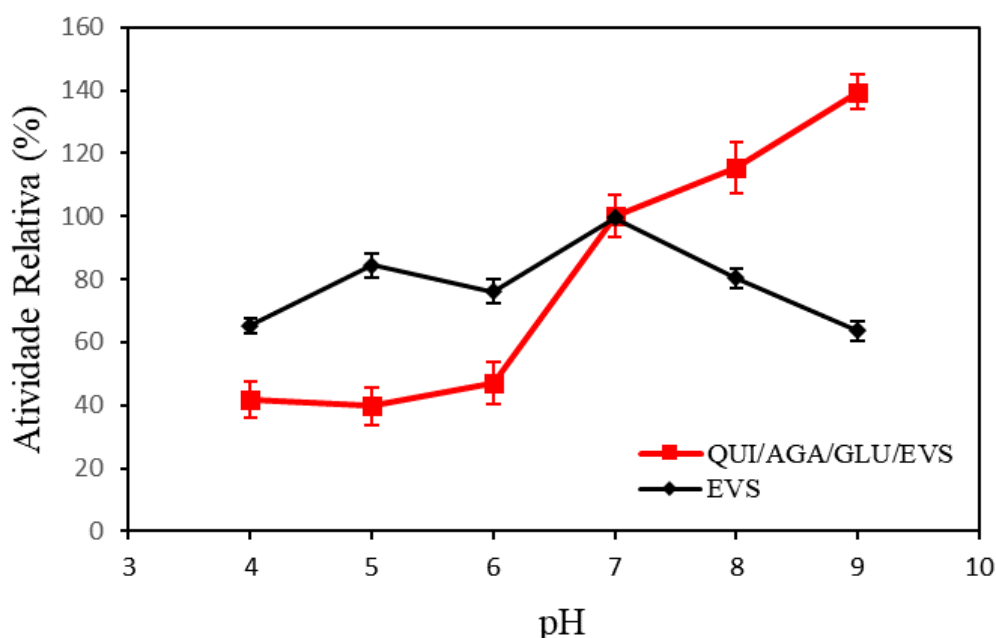
Figura 12 - Efeito da temperatura sobre as enzimas na forma solúvel e imobilizada.



Fonte: Autora.

O efeito do pH sob o desempenho da enzima foi avaliado em uma faixa de valores de 4 a 9, como está representado na figura 13. É possível perceber que a enzima solúvel apresentou uma atividade mais elevada que a imobilizada em pH's ácidos, assim como em outros estudos realizados (DANTAS et al., 2019; MIRANDA et al., 2020). Todavia, a imobilização contribuiu para o aumento da atividade enzimática em pH's alcalinos, elevando a atividade da Eversa® Transform 2.0 até 140% em pH 9. Villeneuve et al. 2000, mostraram que a faixa de pH das lipases imobilizadas é geralmente ligeiramente alterado para valores mais alcalinos. O autor mencionou que a enzima imobilizada pode fornecer atividade relativamente alta valores devido às mudanças conformacionais quando o pH muda (VILLENEUVE et al., 2000).

Figura 13 - Efeito do pH sobre as enzimas livre e imobilizada.

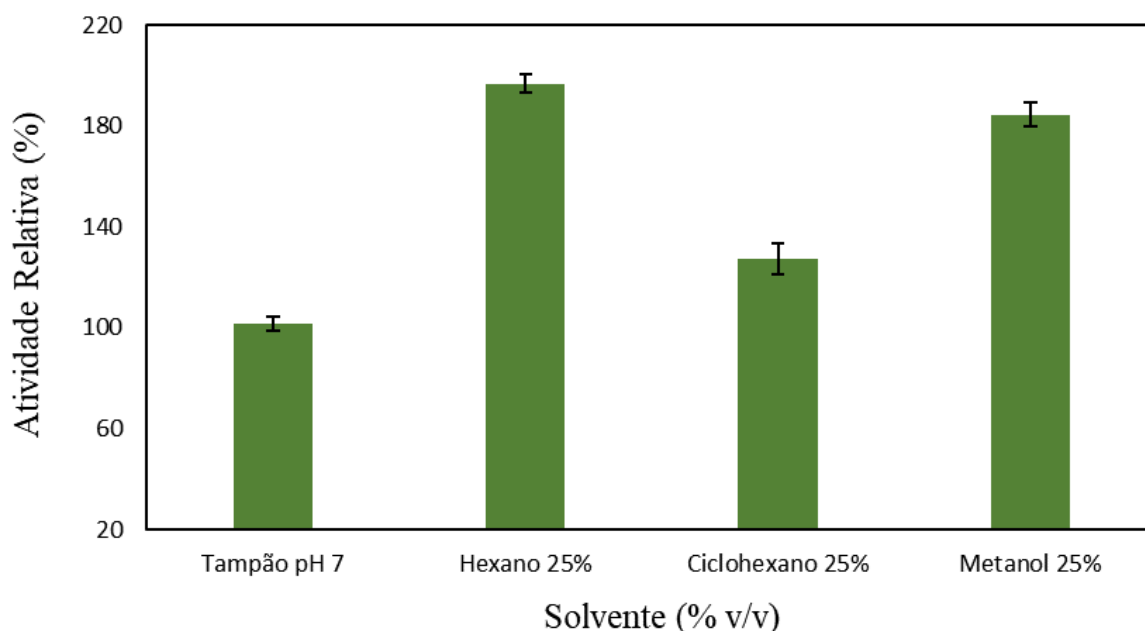


Fonte: Autora.

3.4.4. Estabilidade em solventes orgânicos e teste de desorção da enzima

Solventes orgânicos são reconhecidos como reagentes desnaturantes, porque podem seriamente destruir a estrutura da proteína devido à sua alta polaridade e capacidade de solubilização (WU; YANG; GE, 2017). Para evitar esse problema, a imobilização da enzima em suportes sólidos pode protegê-la da desnaturação contra várias forças de inativação (BAYRAMOGLU et al., 2022). Dessa forma, o efeito de três solventes orgânicos diferentes foi avaliado para controlar a tolerância da lipase, conforme está representado na Figura 14. A presença dos solventes orgânicos hexano, ciclohexano e metanol elevou a atividade do biocatalisador em $96,70\% \pm 0,76$, $27,34\% \pm 2,34$ e $84,35\% \pm 1,68$ respectivamente. Tais ocorrências também foram confirmadas no trabalho de Vahidi et al, 2020 (VAHIDI et al., 2021). Li et al. 2018, em seu estudo relataram que a lipase *Burkholderia cepacia* imobilizada apresentou boa tolerância orgânica em quase todos os solventes orgânicos hidrofóbicos e hidrofílicos utilizados (LI et al., 2018).

Figura 14 - Teste de estabilidade do biocatalisador QUI/AGA/GLU/EVS em solventes orgânicos.



Fonte: Autora.

Apesar da imobilização da lipase em suportes hidrofóbicos ser bem forte, a lipase pode ser liberada do suporte (por exemplo, usando detergentes) e o suporte pode ser reutilizado. Infelizmente, a dessorção da enzima também pode ocorrer sob condições drásticas (alta temperatura, presença de solventes orgânicos), e alguns substratos ou produtos podem até mesmo facilitar a liberação de enzima (por exemplo, ácido graxo livre, monoacetina ou monobutirina) (VIRGEN-ORTÍZ et al., 2017). Para isso foi realizado um teste de dessorção inserindo-se o biocatalisador produzido em diferentes soluções, como tampão 25mM pH 7, NaCl 1M e Triton X-100 0,1% (v/v) em tempos de 30 e 60 minutos (representados na Tabela 5), com o objetivo de identificar se ocorreria o desprendimento da enzima do suporte.

Tabela 5 - Dessorção da EVS imobilizada em QUI/AGA/GLU em uma concentração de 5mg/g de suporte, incubados durante 1h nas condições de 25°C e pH7, sob agitação mecânica moderada.

Tempo de incubação (min)	Dessorção da lipase (%)		
	Tampão 25mM pH 7	NaCl 1M	Triton X-100 0,1% (v/v)
30	0	0	0
60	0	0	0

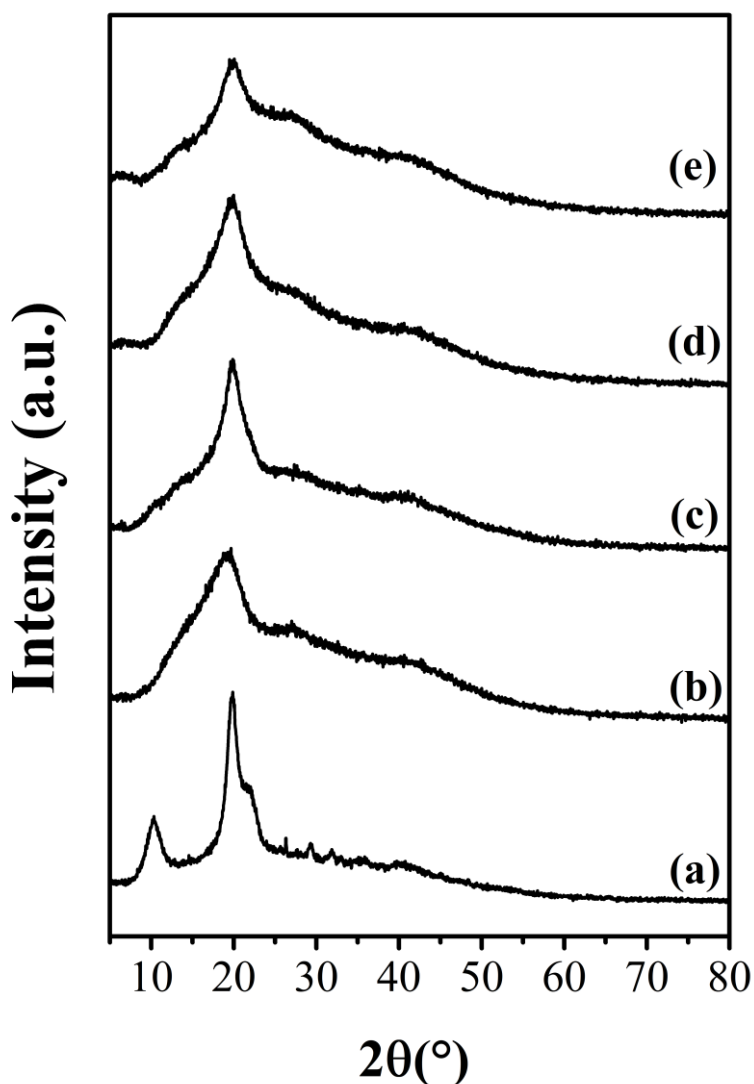
Fonte: Autora.

Ao final dos testes realizados foi possível perceber que não houve desprendimento enzimático do suporte em nenhuma das soluções presentes e nem no tempo de 30 e 60 min, confirmando que a EVS estava fortemente ligada ao suporte QUI/AGA/GLU. No trabalho de Zaak et al. 2017, foi constatado que a presença do glutaraldeído contribui para o não desprendimento entre a enzima e o suporte (ZAAK et al., 2017).

3.4.5. Caracterização de materiais

A Figura 15 (a - e) mostra o padrão de difração obtido a partir de amostras CHI, AGA, QUI/AGA, QUI/AGA/GLU e QUI/AGA/GLU/EVS, respectivamente. Esta técnica permite descrever claramente o precursor inicial quitosana (QUI) e agarose (AGA). O difratograma da quitosana comercial (Figura 15 (a)) mostra dois picos bem definidos quando comparados à quitosana após as reações de ativação. Nesse caso, pode-se atribuir a existência de fase cristalina no caso da quitosana comercial. Segundo Dey e coautores (CHANDRA DEY et al., 2016), os picos em 10 ° e 20 ° são característicos da quitosana (JCPDS # 039-1894) (ANTONINO et al., 2017; GŁĄB et al., 2021).

Figura 15 - Padrão de XRD de: (a) QUI, (b) AGA, (c) QUI / AGA, (d) QUI / AGA / GLU e (e) QUI / AGA / CLU / EVS.



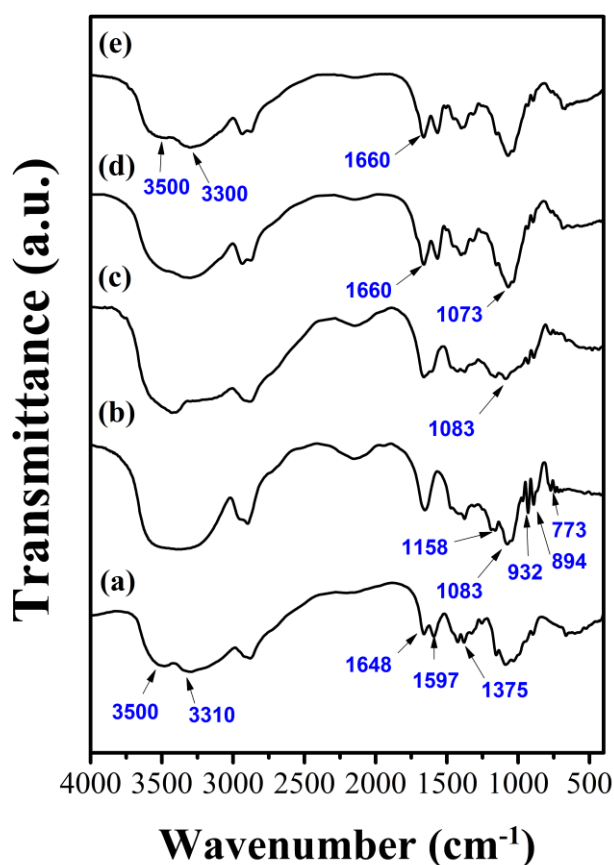
Fonte: Autora.

O pó de agarose apresentou um único pico em torno de $2\theta = 18,2^\circ$ (Figura 15 (b)), que são atribuídos à fase semicristalina da AGA (FUKUI; INAMURA; FUJIMOTO, 2021). Todos os outros difratogramas não mostraram alterações de pico ou desvios em relação ao suporte (QUI/AGA), como mostrado na Figura 15 (b - e). Essas evidências sugerem que a funcionalização e o processo de ligação enzimática não alteram a cristalinidade do suporte (DA S. MOREIRA et al., 2021). Todos os outros difratogramas não mostraram deslocamentos de pico em relação às amostras QUI ou AGA, como mostrado na Figura 15 (c - e). Essa evidência sugere que a funcionalização e o processo de ligação enzimática não causam mudanças no suporte. Além disso, também é possível

observar a diminuição da cristalinidade do sistema devido às etapas de imobilização do substrato.

Informações sobre ligações químicas presentes na estrutura da quitosana e agarose do suporte, bem como a interação com o glutaraldeído e a enzima foram analisadas por FTIR. Os modos vibracionais encontrados para as amostras são descritos na Figura 16.

Figura 16 - Espectros de FTIR para (a) QUI, (b) AGA, (c) QUI / AGA, (d) QUI/ AGA / GLU e (e) QUI / AGA / GLU / EVS.



Fonte: Autora.

O espectro de FTIR para a amostra de quitosana (QUI) descreveu uma banda larga em torno de 3000-3500 cm⁻¹ das ligações intermoleculares de hidrogênio O-H e 1597 cm⁻¹ das ligações N-H (PARSA; PAYDAYESH; DAVACHI, 2019; VARMA; VASUDEVAN, 2020). 3010 cm⁻¹ (ligações N-H) e 1648 cm⁻¹ podem ser atribuídos às vibrações da amida II (HU et al., 2016). As ligações químicas C-O foram atribuídas às bandas em 1150 e 1060 cm⁻¹. Finalmente, os modos em 1646, 1588 e 1375 cm⁻¹ são atribuídos aos grupos amida I, II e III, respectivamente (BALALI et al., 2018). Para a

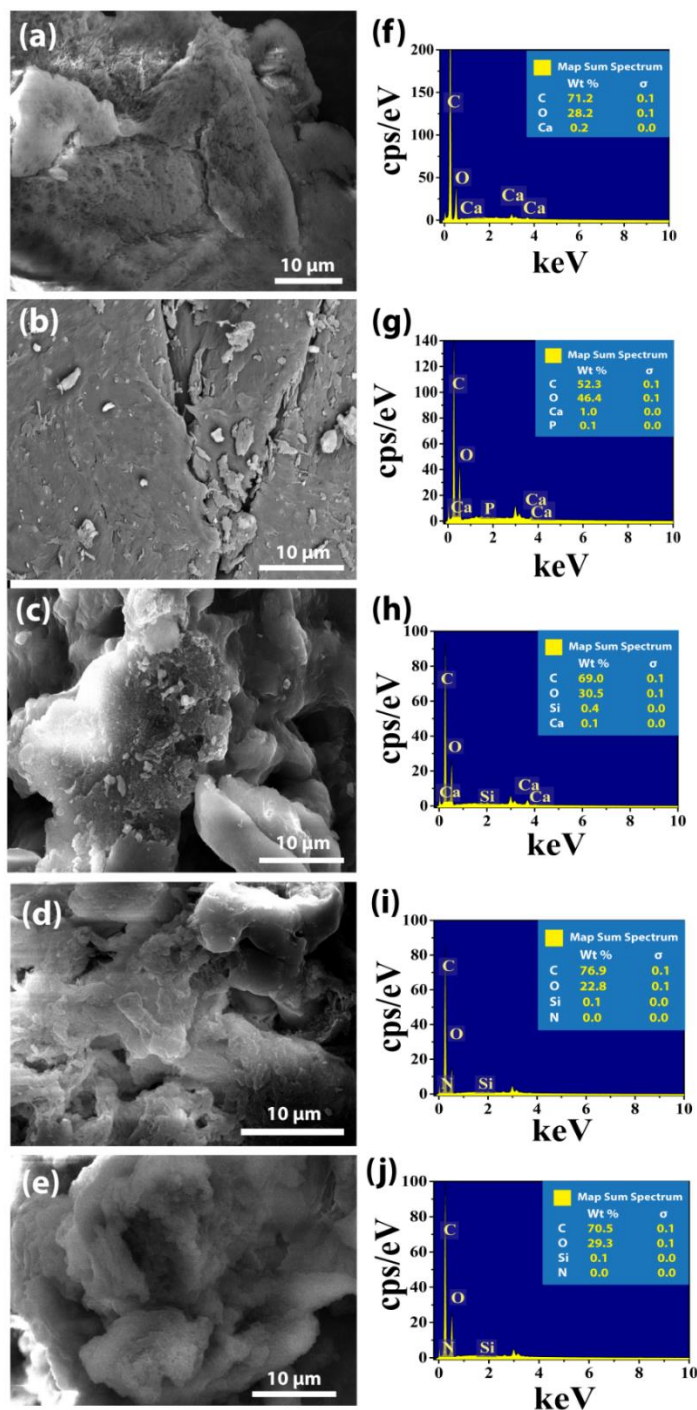
amostra de agarose (AGA), bandas de estiramento de ligações OH em 3000-3500 cm^{-1} também foram identificadas (Figura 16 (b)). Bandas características de AGA em 773, 894 e em 932 cm^{-1} foram atribuídas à estrutura de 3,6-anidro- β -galactose, além das bandas em 1158 e 1083 cm^{-1} correspondentes a C-O-C de ligações glicosídicas, respectivamente (TRIVEDI; KUMAR, 2014).

O espectro da amostra QUI/AGA (mistura de quitosana / agarose, Figura 16 (c)) contém a presença de todas as bandas características de ambas as estruturas, sendo possível observar um aumento da intensidade relativa em algumas bandas, devido à sobreposição de grupos de acordo com a mistura. Porém, em outras bandas, foi possível verificar intensidades menores, sugerindo a ocorrência de interações entre AGA e CHI. Uma banda comum às duas amostras em 1083 cm^{-1} é relativa à ligação C-O da ligação glicosídica, diminuída em intensidade relativa na amostra QUI/AGA (SAEEDI GARAKANI et al., 2020). A Figura 16 (d) mostra a amostra funcionalizada com glutaraldeído (QUI/AGA/GLU). Além das bandas características de quitosana e agarose, foi identificada a vibração de alongamento C-O das ligações glicosídicas. Porém, foi observado um pequeno deslocamento em torno de 1073 cm^{-1} e um aumento na intensidade da banda em relação à ligação N-H da amina I (1660 cm^{-1}), confirmando a presença de glutaraldeído (GLU) (SINGH et al., 2017).

Para a amostra com incorporação da enzima (EVS) no suporte conforme mostrado na Figura 16 (e), foi descrita como QUI / AGA / GLU / EVS. O espectro FTIR para este composto mostrou bandas características das estruturas precursoras, como discutido acima. Nesse caso, assim como na quitosana e na agarose, uma banda larga em torno de 3000 - 3500 cm^{-1} das ligações O-H foi observada, bem como em 3300 cm^{-1} da ligação N-H (PAWLAK; MUCHA, 2003; PINHEIRO et al., 2019a). Porém, foi possível verificar uma diminuição na intensidade dessa banda, quando comparada à amostra QUI/AGA/GLU, o que pode estar relacionado à interação da enzima com o suporte.

Imagens MEV mostraram a interação dos polímeros QUI e AGA através da inspeção de superfície, bem como a incorporação de GLU e EVS apresentados nas Figuras 17 (a), (b), (c), (d) e (e). Além disso, as micrografias descreveram a morfologia da superfície, bem como a porosidade do suporte antes e após a adição da enzima. Os espectros de EDS foram apresentados nas Figuras 17 (f), (g), (h), (i) e (j) com variações discretas das composições elementares, variando a composição de átomos como cálcio e silício. Além disso, é possível verificar o aumento da porção orgânica no material de suporte pela adição de GLU e enzima.

Figura 17 - Micrografias MEV de mapas de amostras / EDS para (a / f) AGA, (b / g) QUI, (c / h) QUI / AGA, (d / i) QUI / AGA / GLU e (e / j) QUI / AGA / GLU / EVS.



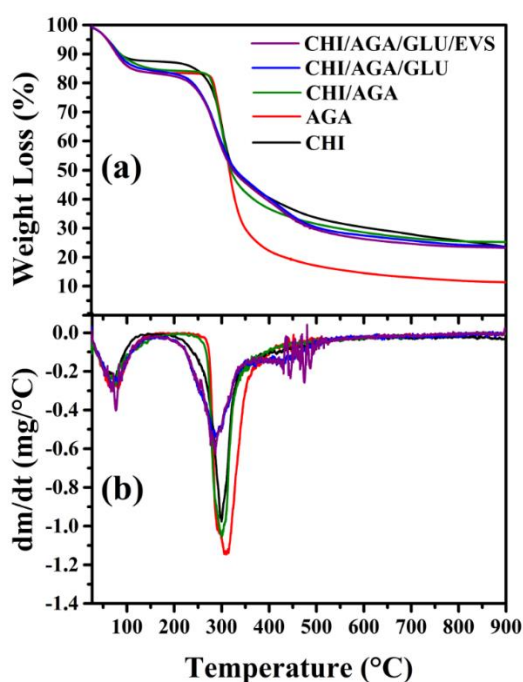
Fonte: Autora.

O aumento na proporção de átomos de carbono na (Figura 17 (c e d)) pode estar relacionado à interação de polímeros e GLU na síntese do suporte. A Figura 17 (e) mostra claramente a rugosidade do material após a imobilização. A imobilização da EVS pode estar relacionada ao aumento da porcentagem da massa de oxigênio na Figura 17 (j),

portanto, MEV e EDS auxiliaram como análises complementares para determinar que a enzima estava imobilizada na superfície do suporte.

As curvas TGA/DTG para as amostras são descritas na Figura 18 (a) e (b). Os produtos elaborados foram analisados e foi observada a ocorrência de dois eventos relacionados à degradação do material em todos eles. O primeiro descreve a temperatura máxima de 85,8°C e perda de peso em torno de 22,4%, indicando composição volátil presente nas amostras (a) e um percentual substancial de água. AGA e QUI / AGA apresentaram o mesmo perfil de degradação, com perda de massa em torno de 26% na faixa de 89 ° C a 264 ° C (CAO et al., 2018). QUI / AGA / GLU e QUI / AGA / GLU / EVS apresentaram perfil de degradação semelhante na faixa de 96 ° C a 222 ° C apresentando uma maior perda de massa neste primeiro evento em torno de 29%. O segundo evento ocorreu com grande perda de massa de 220 ° C até a estabilização após 700 ° C. Conforme esperado, exceto para AGA, as amostras QUI/AGA/GLU e QUI/AGA/GLU/EVS apresentaram menores valores de perda de massa, provavelmente devido ao aumento de componentes orgânicos incorporados e enzimas imobilizadas.

Figura 18 - Análise de TGA (a) e o DTG (b) das amostras QUI, AGA, QUI / AGA, QUI / AGA / GLU e QUI / AGA / GLU / EVS.

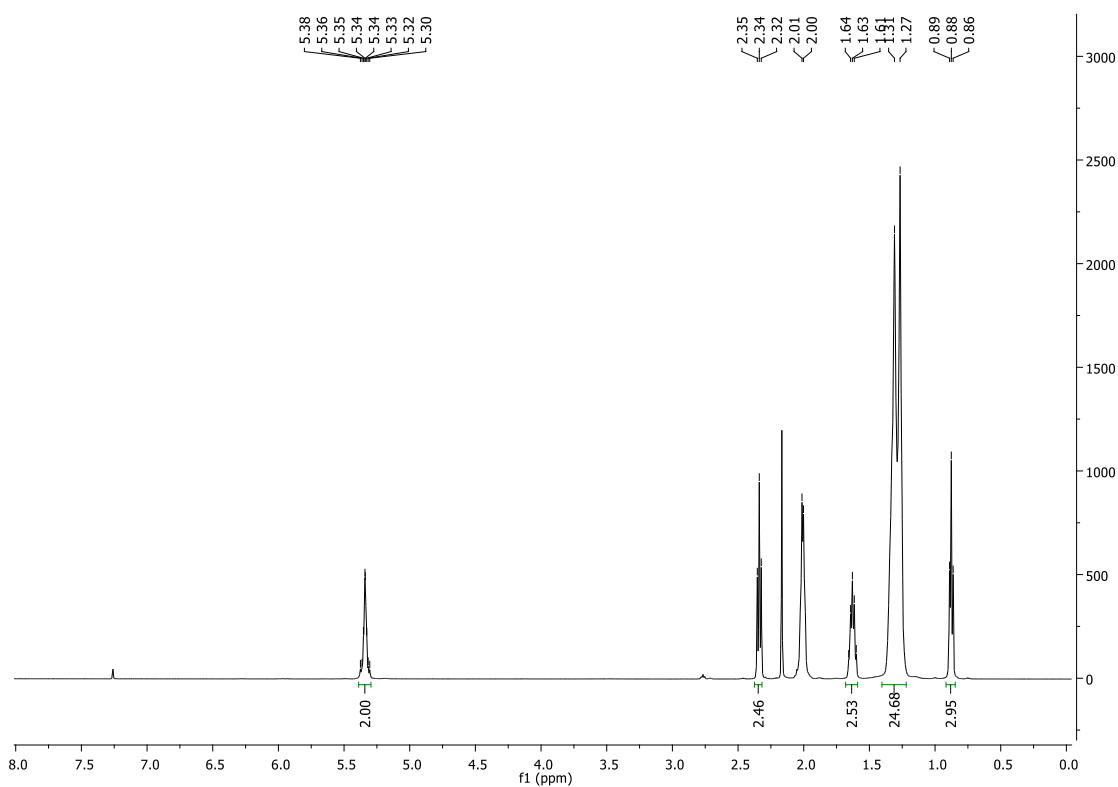


Fonte: Autora.

Além do segundo evento térmico, as curvas DTG (Fig. 18 (B)) apresentaram perfil de degradação com menor faixa de temperatura da amostra imobilizada (QUI/AGA/GLU/EVS) quando comparada aos materiais não ativados.

Na espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), os deslocamentos químicos foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN de ^1H pelo pico do hidrogênio pertencente à fração não deuterada do solvente utilizado: CDCl_3 (δ_{H} 7,27). As multiplicidades dos sinais de hidrogênios nos espectros de RMN de ^1H foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), t (triplete), m (multiplete).

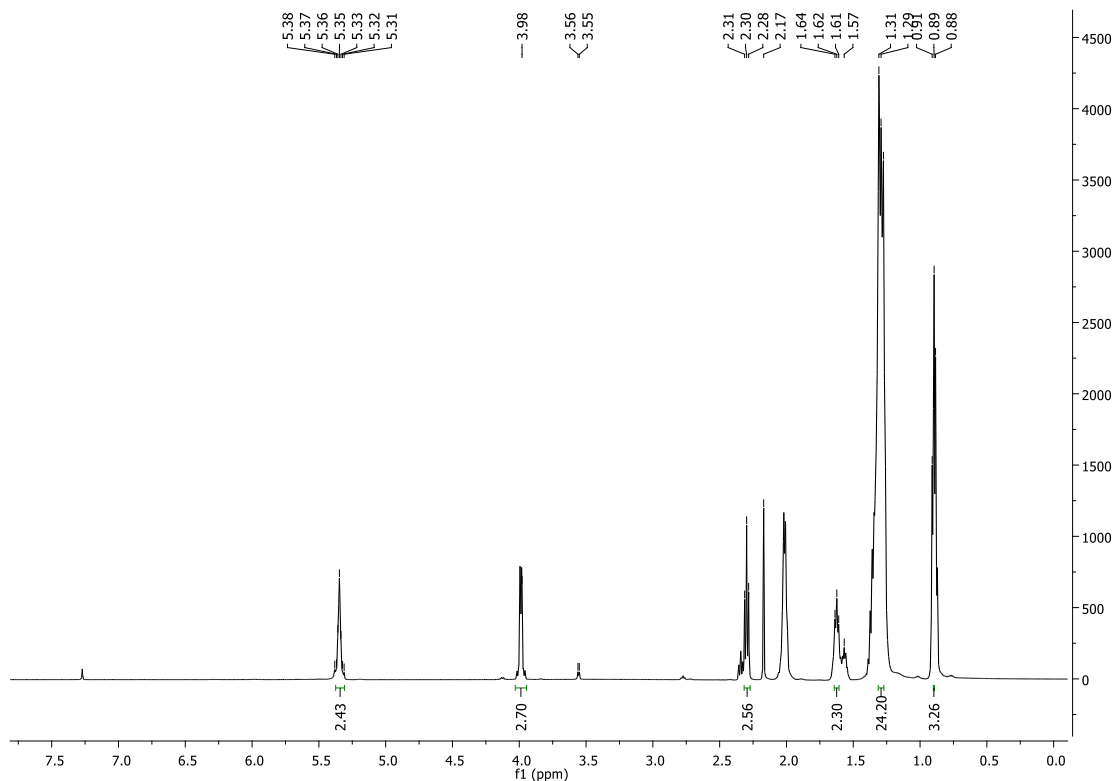
Figura 19 - Espectro de caracterização do ácido oleico. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.57 – 5.16 (m, 2H), 2.34 (t, 2H), 1.76 – 1.53 (m, 2H), 1.29 (d, 24H), 0.9 (t, 3H).



Fonte: Autora.

Um triplete (t) em δ 0.9 ppm relatado aos hidrogênios metílicos terminais, um multiplete (m) em δ 1.6 ppm assinalados aos hidrogênios metilênicos na posição β -carbonila, um triplete (t) em δ 2.34 ppm aos hidrogênios metilênicos posicionados α -carbonila e os sinais associados aos hidrogênios alílicos, multiplete (m) em δ 5.3 ppm.

Figura 20 - Espectro de caracterização do biolubrificante. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 5.37 – 5.31 (m, 2H), 3.98 (s, 3H), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H), 1.64 – 1.61 (m, 2H), 1.31 – 1.29 (m, 24H), 0.89 (t, 3H).



Fonte: Autora.

O espectro RMN ^1H do biolubrificante mostrou sinais característicos de éster metílico. Os sinais próximos em δ 5,3 e δ 2,1 ppm estão relacionados com os hidrogênios metilênicos localizados nas posições α e β -carbonila. O pico em δ 3,9 ppm é associado aos hidrogênios de éster metílico e o tripleto em torno de δ 0,9 ppm é referente aos hidrogênios metílicos terminais da cadeia alquílica. O metileno alfa para o grupo éster é um tripleto em δ 2,3 ppm e o grupo beta está em δ 1,6 ppm. Os prótons dos grupos metilênicos restantes têm frequências de ressonância semelhantes e se sobrepõem na faixa de δ 1,3 ppm.

3.4.6. Produção de ésteres por biocatálise

A lipase modificada Eversa® Transform 2.0 tem se mostrado muito promissora na produção de ésteres biolubrificantes. De acordo com as condições de reação destacadas, houve uma conversão de 40,3%, que apresenta um grau de síntese notável, considerando que a lipase utilizada ainda é pouco explorada e que quando comparada a outros trabalhos descritos na literatura, utilizando os mesmos substratos, a conversão os

valores estão dentro do intervalo esperado. Schlepütz e colaboradores esterificaram o 2-etil-1-hexanol com ácido oleico catalisado por lipase e obtiveram uma conversão superior a 60%. No entanto, a lipase utilizada foi a *Thermomyces lanuginosus*, e o suporte de imobilização Sylgard® 184, ambos amplamente utilizados na produção de biolubrificantes enzimáticos e utilizados em uma faixa de temperatura mais elevada (SCHLEPÜTZ et al., 2008). Outro trabalho que relata o uso dessas lipases na produção de ésteres é o de Kleinaite et al., 2014, que otimiza a esterificação com Lipozyme TL IM, obtendo uma conversão máxima de 80% (KLEINAITE et al., 2014). Embora a mesma faixa de temperatura utilizada no presente trabalho seja mantida, o tempo de reação foi estendido para obter maiores conversões.

Outro ponto crítico para o desempenho deste trabalho se mostrar inferior aos citados anteriormente é que no sistema reacional não houve solvente orgânico ou qualquer adição de água. No entanto, a maioria dos substratos utilizados nas reações de esterificação tem baixa miscibilidade, o que torna necessária a presença de solvente orgânico no sistema reacional como fator relevante para aumentar a conversão, Paroul et al., 2011 demonstraram em seu trabalho que sistemas enzimáticos sem solvente podem apresentar alta eficiência (PAROUL et al., 2011). O trabalho realizado por Brenneis & Baeck, 2012, apresentou os maiores valores de conversão para esterificações biocatalíticas. Utilizando a enzima lipase A de *Candida antarctica* (CALA) e água no meio, observou-se uma grande área interfacial entre a enzima e os substratos/água, causada por agitação de alta intensidade, o que é benéfico para a enzima que precisa ser ativada por meio de absorção da interface (BRENNEIS; BAECK, 2012). Essa adsorção provoca a abertura da tampa do sítio catalítico da enzima, aumentando sua atividade. Assim, é possível que, modificando alguns parâmetros de reação, como temperatura, tempo de reação, agitação e até suporte de imobilização, possam ser obtidos valores de conversão mais expressivos.

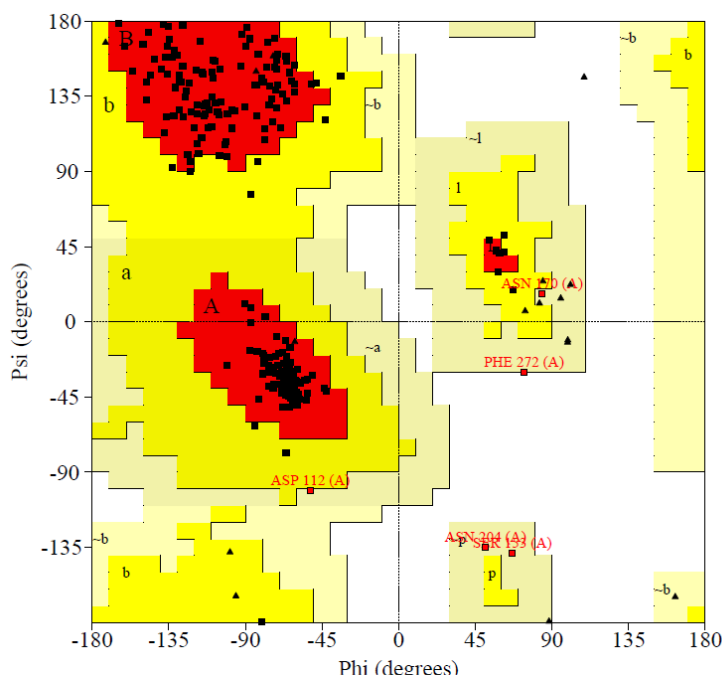
3.4.7. Docking molecular

3.4.8. Modelagem de proteínas

O gráfico de Ramachandran, Figura 21. Mostrou 91,5% de seus resíduos nas regiões favoráveis (Região vermelha). Nas regiões adicionalmente permitidas (Regiões a, b, l, p, amarelo) de 6,5%, nas regiões generosamente permitidas (Regiões ~a, ~b, ~l, ~p, ou seja, amarelo claro) foi de 1,6%, e nas regiões desfavoráveis (Região em branco) foi de 0,4%. Os resíduos encontrados em regiões desfavoráveis refletem as estruturas

usadas como molde, e alguns estão nas extremidades da proteína. Portanto, os dados do gráfico Ramachandran suportam o modelo obtido. Assim, foi possível reconhecer as regiões estruturalmente conservadas e as regiões variáveis com alinhamento, observando os resíduos estruturalmente equivalentes na sequência primária no processo de identificação da lipase (PAL et al., 2014).

Figura 21 - Gráfico Ramachandran padronizado da Eversa.



Fonte: Autora.

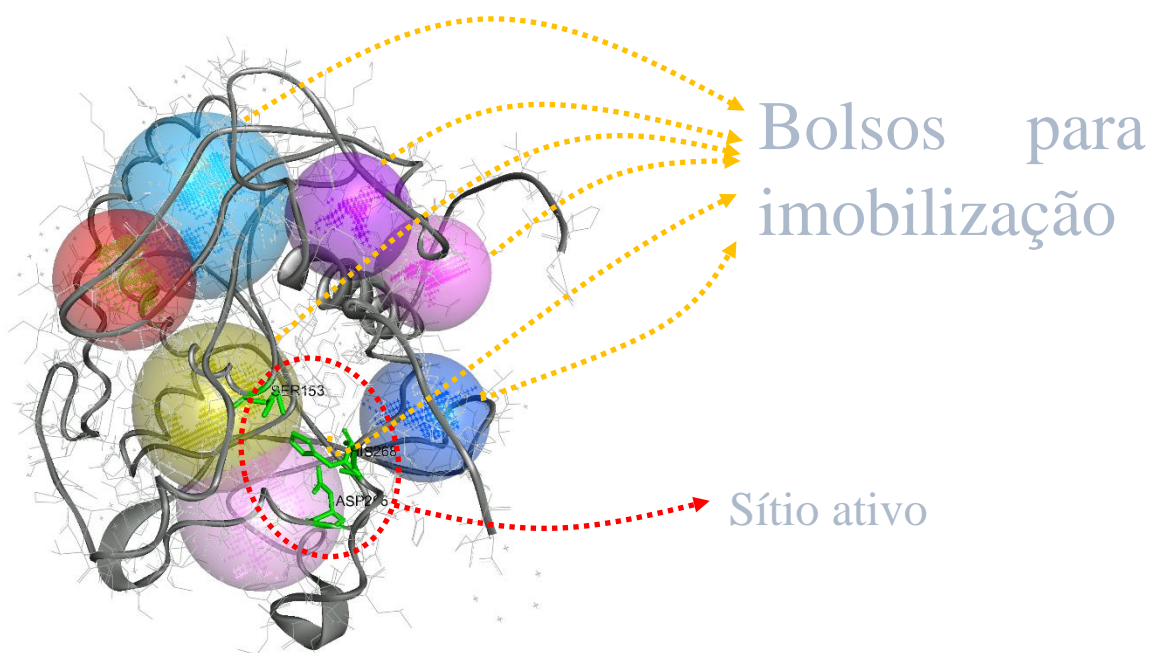
3.4.9. Interação entre o suporte e a lipase

Estudos de acoplamento molecular foram realizados para justificar as abordagens utilizadas para explicar os resultados observados para a lipase. Assim, para fins de imobilização, ela foi analisada estruturalmente por modelagem molecular por um estudo de acoplamento de lipase Eversa lipase (modelado) usando o Software AutoDock Vina e DS para prever sua afinidade, orientação e superfícies circundantes. De acordo com a literatura, as forças de van der Waals e as ligações de hidrogênio foram favoráveis com as afinidades de ligação previstas pelos estudos de acoplamento molecular (CHATURVEDI et al., 2015).

O sítio catalítico da Eversa® Transform 2.0, uma tríade representada por Ser 153, His 268 e Asp 206, com resíduo de serina atuando como nucleófilo, está localizado dentro da bolsa do substrato. Apenas substratos de formas moleculares apropriadas podem ocupar esses subsítios para sofrer catálise. Os rigorosos requisitos de confirmação de substrato para os sítios ativos Eversa® Transform 2.0 e sítios de ligação ao substrato

oferecem a possibilidade de encontrar sítios de ligação específicos nas regiões inativas da superfície da enzima para orientar a direção da imobilização. CASTp foi usado para selecionar bolsos de superfície alcançáveis para encadernação (TIAN et al., 2018). Com base no princípio de seleção de sítios de imobilização, foram encontradas sete cavidades distantes da tríade catalítica, o que equivale ao sítio ativo da enzima, conforme mostra a Figura 22.

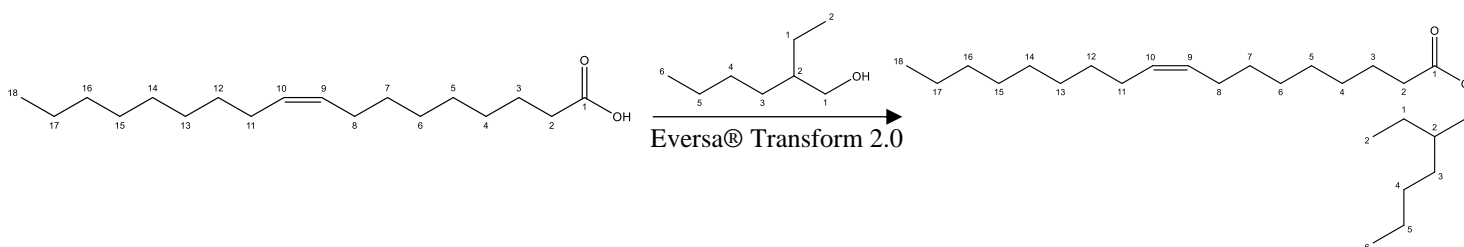
Figura 22- Detecção de sete cavidades pelo website CASTp.



Fonte: Autora.

A afinidade de ligação para o ácido oleico ancorado com a enzima foi estimada em -5,1 kcal/mol. A menor energia de ligação sugere que a combinação do substrato com a lipase foi mais estável e adequada para esterificação, conforme Figura 23.

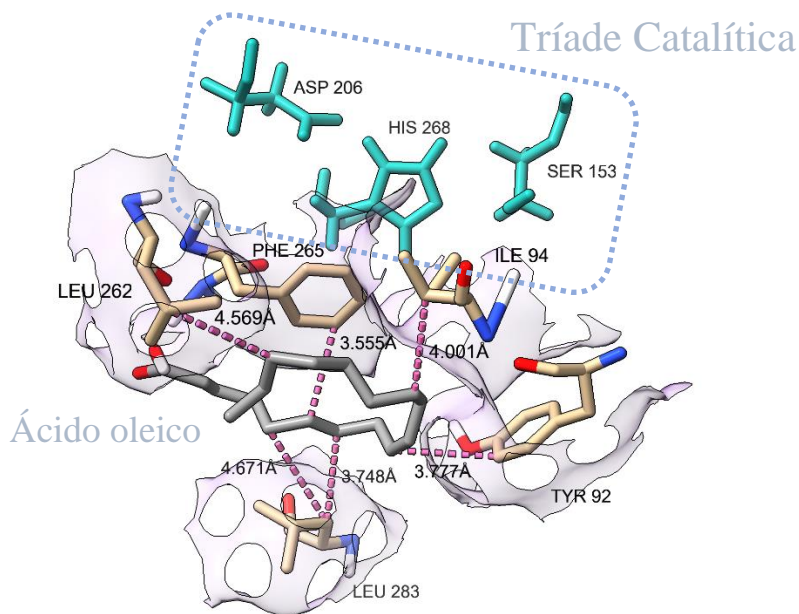
Figura 23 - Reação de esterificação de ácido oleico e álcool com a Eversa®Transform 2.0.



Fonte: Autora.

Ser 153, His 268 e Asp 206 (BEN HLIMA et al., 2021; CEN et al., 2019), é a tríade catalítica observada, conforme mostrado na Figura 24. Isso sugere que após a imobilização, a tríade permanecerá ativa para a biorreação de Eversa com ácido oleico, que interagiu com os resíduos das cavidades hidrofóbicas Tyr 92 (3,7 Å), Ile 94 (4,0 Å), Leu 262 (4,6 Å), Phe 265 (3,6 Å) e Leu 283 (3,7 Å/4,7 Å), onde todos eram do tipo π -alquil.

Figura 24 - Interações do ácido oleico entre a tríade catalítica da Eversa lipase Ser153-His268-Asp206 (azul) e resíduos de aminoácidos.



Fonte: Autora.

3.5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados neste trabalho, foi possível concluir que o método Taguchi é eficiente para otimização experimental, proporcionando as melhores condições de reação e garantindo a produção de um biocatalisador QUI/AGA/GLU/EVS com atividade ótima de $74,39 \pm 0,48$ U/g. Testes que caracterizam os materiais: Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), Espectroscopia Dispersiva de Energia (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) confirmaram a união dos polímeros de quitosana e agarose na formação do suporte híbrido, bem como ativação realizada com glutaraldeído e imobilização da lipase. Além disso, eles provaram que a incorporação do glutaraldeído e a ligação da enzima não alteram esse suporte. O ensaio de carga máxima de suporte mostrou que o derivado com maior atividade foi atingido com uma carga de 23mg de enzima por 1g de suporte. Além disso, o biocatalisador ainda apresentou excelente Atividade mesmo após 61 dias de armazenamento, além de aumentar sua Atividade em pH's alcalinos, altas temperaturas e na presença de solventes orgânicos, sem descolamento entre enzima e Apoio, suporte.

O biocatalisador mostrou-se satisfatório na síntese de biolubrificantes, com conversão de 40,3%, considerada satisfatória visto que a lipase utilizada neste estudo é recente no mercado e, portanto, pouco explorada em estudos. O espectro de RMN revelou os sinais característicos de um éster metílico. Usando análise in silico, verificou-se que o ácido oleico pode se ligar próximo ao sítio ativo da enzima com a melhor energia livre de -5,4 Kcal/mol através da interação π -alquil. Para a homologia Eversa® Transform 2.0, o gráfico Ramachandran apresentou 91,5% de seus resíduos nas regiões favoráveis. Nas áreas adicionais permitidas de 6,5%, nas regiões generosamente permitidas foi de 1,6% e nas regiões desfavoráveis foi de 0,4%, o que foi considerado uma estrutura relativamente estabilizada. Diante dos resultados obtidos, o estudo apresentado revela um novo biocatalisador com propriedades interessantes para a produção de biolubrificantes, trazendo consigo materiais com vantagens em termos de acessibilidade, custo e síntese.

3.6.REFERÊNCIAS

ABIFARIN, J. K.; PRAKASH, C.; SINGH, S. Optimization and significance of fabrication parameters on the mechanical properties of 3D printed Chitosan/PLA scaffold. **Materials Today: Proceedings**, n. xxxx, 2021.

AGHAEI, H.; YASINIAN, A.; TAGHIZADEH, A. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* on epoxy-activated cloisite 30B as a new heterofunctional carrier and its application in the synthesis of banana flavor and production of biodiesel. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 178, p. 569–579, 2021.

AGUIEIRAS, É. C. G. et al. Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials. **Renewable Energy**, v. 148, n. xxxx, p. 689–696, 2020.

ALAFAGHANI, A.; QATTAWI, A. Investigating the effect of fused deposition modeling processing parameters using Taguchi design of experiment method. **Journal of Manufacturing Processes**, v. 36, n. December 2017, p. 164–174, 2018.

ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, 1990.

ANTONINO, R. S. C. M. D. Q. et al. Preparation and characterization of chitosan obtained from shells of shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone). **Marine Drugs**, v. 15, n. 5, 2017.

ATTIA, N. K. et al. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, v. 271, n. March, p. 117578, 2020.

BALALI, S. et al. Preparation and Characterization of Composite Blends Based on Polylactic Acid/Polycaprolactone and Silk. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 11, 2018.

BARBOSA, M. S. et al. Biolubricant production under zero-waste *Moringa oleifera* Lam biorefinery approach for boosting circular economy. **Industrial Crops and Products**, v. 167, n. November 2020, 2021.

BAYRAMOGLU, G. et al. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. **Food Chemistry**, v. 366, n. April 2021, p. 130699, 2022.

BEDOYA, O. F.; TISCHER, I. Detección de homología remota de proteínas usando modelos 3D enriquecidos con propiedades fisicoquímicas. **INGENIERÍA Y COMPETITIVIDAD**, v. 17, n. 1, 2015.

BEN HLIMA, H. et al. Molecular and Structural Characterizations of Lipases from *Chlorella* by Functional Genomics. **Marine drugs**, v. 19, n. 2, 2021.

BERING, L.; THOMPSON, J.; MICKLEFIELD, J. **New reaction pathways by integrating chemo- and biocatalysis** *Trends in Chemistry*, 2022.

BEZERRA, R. M. et al. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, n. March, p. 109560, 2020.

BICKERSTAFF, G. F. Immobilization of Enzymes and Cells: Some Practical Considerations. **Immobilization of Enzymes and Cells**, v. 1, p. 1–12, 2003.

- BOLINA, I. C. A.; GOMES, R. A. B.; MENDES, A. A. Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: Current Scenario and Future Perspectives. **Bioenergy Research**, 2021.
- 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, 2018.
- BORNSCHEUER, U. T. Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 42, n. 29, p. 3336–3337, 2003.
- 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. 248–254, 1976.
- BRENNEIS, R.; BAECK, B. Esterification of fatty acids using Candida antarctica lipase A in water-abundant systems. **Biotechnology Letters**, v. 34, n. 8, 2012.
- CAO, L. Immobilised enzymes: Science or art? **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, n. 2, p. 217–226, 2005.
- CAO, Q. et al. Hydrophobicity and physicochemical properties of agarose film as affected by chitosan addition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 106, 2018.
- CARNEIRO, E. A. et al. IMPROVING the CATALYTIC FEATURES of the LIPASE from Rhizomucor miehei IMMOBILIZED on CHITOSAN-BASED HYBRID MATRICES by ALTERING the CHEMICAL ACTIVATION CONDITIONS. **Quimica Nova**, v. 43, n. 9, p. 1234–1239, 2020.
- CASAS-GODOY, L.; DUQUESNE, S.; BORDES, F. Lipases and Phospholipases. **Methods Mol Biol**, v. 861, p. 3–30, 2012.
- CAVALCANTE, A. L. G. et al. Preparation, Characterization, and Enantioselectivity of Polyacrylate Microcapsules Entrapping Ananas comosus Extract. **Revista Virtual de Quimica**, v. 13, n. 6, p. 1319–1329, 2021a.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. **Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization** Catalysts, 2021b.
- CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from Candida rugosa. **Fuel**, v. 215, n. October 2017, p. 705–713, 2018.
- CEN, Y. et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.
- CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 491–499, 2013.
- CHANDRA DEY, S. et al. PREPARATION , CHARACTERIZATION AND PERFORMANCE EVALUATION OF CHITOSAN AS AN ADSORBENT FOR REMAZOL RED. **International Journal of Latest Research in Engineering and Technology**, 2016.

- CHANDRA, P. et al. **Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review**. [s.l.] BioMed Central, 2020. v. 19
- CHANG, M. Y.; CHAN, E. S.; SONG, C. P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase methanol tolerance and kinetic model. **Fuel**, v. 283, n. October 2020, 2021.
- CHATURVEDI, S. K. et al. Unraveling comparative anti-amyloidogenic behavior of pyrazinamide and D-Cycloserine: A mechanistic biophysical insight. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- CHENTHAMARAKSHAN, A. et al. Optimization of laccase production from *Marasmiellus palmivorus* LA1 by Taguchi method of Design of experiments. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443–1454, nov. 2015.
- DA FONSECA, A. M. et al. Synthesis, biological activity, and in silico study of bioesters derived from bixin by the calb enzyme. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 5, p. 5901–5917, 2022.
- DA S. MOREIRA, K. et al. Taguchi design-assisted Co-immobilization of Lipase A and B from *Candida antarctica* onto Chitosan: characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 7, p. 223–244, 2021.
- DANTAS, A. et al. Potential application of *Thermomyces lanuginosus* lipase (TLL) immobilized on nonporous polystyrene particles. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 38, n. 2, p. 608–613, 2019.
- DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 2013.
- DE OLIVEIRA, A. L. B. et al. **Lipases immobilized onto nanomaterials as biocatalysts in biodiesel production: Scientific context, challenges, and opportunities** *Revista Virtual de Química*, 2021.
- DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 4, p. 1263–1285, 2018.
- DE SOUZA, T. C. et al. Modulation of lipase B from *Candida antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanyl acetate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 12, p. 2253–2268, 1 dez. 2020.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Evaluation of divinylsulfone activated agarose to immobilize lipases and to tune their catalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 6, p. 918–927, 2015.
- DROUT, R. J.; ROBISON, L.; FARHA, O. K. Catalytic applications of enzymes encapsulated in metal–organic frameworks. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 381, p. 151–160, 2019.

- ELIAS, N. et al. Taguchi orthogonal design assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto nanocellulose-silica reinforced polyethersulfone membrane: physicochemical characterization and operational stability. **Cellulose**, v. 28, n. 9, p. 5669–5691, 2021.
- FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, v. 362, n. March, p. 122–129, 2021.
- FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Stabilizing effects of cations on lipases depend on the immobilization protocol. **RSC Advances**, v. 5, n. 102, p. 83868–83875, 2015.
- FERREIRA GONÇALVES, G. R. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111, n. October, p. 114–123, 2021.
- FERREIRA MOTA, G. et al. **Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects** *Algal Research*, 2022.
- FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.
- FONSECA, T. DE S. et al. Lipase mediated enzymatic kinetic resolution of phenylethyl halohydrins acetates: A case of study and rationalization. **Molecular Catalysis**, v. 485, n. September 2019, p. 110819, 2020.
- FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 122, p. 653–658, 2019.
- FUKUI, Y.; INAMURA, R.; FUJIMOTO, K. Preparation of agarose xerogel nanoparticles by solvent evaporation from water nanodroplets. **Polymer Journal**, v. 53, n. 7, 2021.
- GHASEMI, S. et al. Covalent binding and in-situ immobilization of lipases on a flexible nanoporous material. **Process Biochemistry**, v. 102, n. July 2020, p. 92–101, 2021.
- GŁĄB, M. et al. Multistep chemical processing of crickets leading to the extraction of chitosan used for synthesis of polymer drug carriers. **Materials**, v. 14, n. 17, 2021.
- GÜR, S. D.; İDİL, N.; AKSÖZ, N. Optimization of Enzyme Co-Immobilization with Sodium Alginate and Glutaraldehyde-Activated Chitosan Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 2, p. 538–552, 2018.
- HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **Journal of Computational Chemistry**, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, dez. 2012.
- HEIKAL, E. K. et al. Manufacturing of environment friendly biolubricants from vegetable oils. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 26, n. 1, p. 53–59, 2017.
- HU, Z. et al. Preparation and characterization of chitosan-agarose composite films. **Materials**, v. 9, n. 10, 2016.

- ISMAIL, A. R.; KASHTOH, H.; BAEK, K. H. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 187, n. May, p. 127–142, 2021.
- KARMAKAR, B.; DHAWANE, S. H.; HALDER, G. Optimization of biodiesel production from castor oil by Taguchi design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2684–2695, abr. 2018.
- KIM, H. et al. Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. **Renewable Energy**, v. 130, p. 489–494, 2019.
- KLEINAITE, E. et al. A cleaner approach for biolubricant production using biodiesel as a starting material. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, 2014.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, 1993.
- LI, K. et al. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase via immobilization on melamine-glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, n. June, p. 258–268, 2018.
- LIMA, P. J. M. et al. An overview on the conversion of glycerol to value-added industrial products via chemical and biochemical routes. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.2098, jan. 2021.
- LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, n. August, p. 396–408, 2021.
- MELO, A. D. Q. et al. Synthesis of benzyl acetate catalyzed by lipase immobilized in nontoxic chitosan-polyphosphate beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2165, 7 dez. 2017.
- MIRANDA, L. P. et al. Composites of crosslinked aggregates of eversa® transform and magnetic nanoparticles. Performance in the ethanolysis of soybean oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 9–11, 2020.
- MO, H.; QIU, J. Preparation of chitosan/magnetic porous biochar as support for cellulase immobilization by using glutaraldehyde. **Polymers**, v. 12, n. 11, p. 1–14, 2020.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of Lipase A from Candida antarctica onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 17 ago. 2019a.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from Candida antarctica Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts' Performance under Ultrasonic Irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5807, 19 nov. 2019b.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. **Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?** **Renewable Energy**, 2021a.
- MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from Candida antarctica. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141–154, 2021b.
- MOREIRA, K. DA S. et al. Lipase From Rhizomucor miehei Immobilized on Magnetic

Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 693, 30 jun. 2020.

MORRIS, G. M. et al. Software news and updates AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MORTAZAVI, S.; AGHAEI, H. Make proper surfaces for immobilization of enzymes: Immobilization of lipase and α -amylase on modified Na-sepiolite. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1–12, 2020.

NAZOR, J.; LIU, J.; HUISMAN, G. Enzyme evolution for industrial biocatalytic cascades. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 182–190, 2021.

NERY, E. W.; KUBOTA, L. T. Evaluation of enzyme immobilization methods for paper-based devices-A glucose oxidase study. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 117, p. 551–559, 2016.

NUNES, Y. L. et al. Chemical and physical Chitosan modification for designing enzymatic industrial biocatalysts: How to choose the best strategy? **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 1124–1170, 2021.

NWAGU, T. N.; OKOLO, B.; AOYAGI, H. Immobilization of raw starch saccharifying amylase on glutaraldehyde activated chitin flakes increases the enzyme operation range. **Bioresource Technology Reports**, v. 13, n. December 2020, p. 100645, 2021.

OKURA, N. S. et al. Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion exchange plus hydrophobic interactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 550–561, 15 nov. 2020.

PAL, G. et al. Modelagem molecular de proteínas: o caso de uma glucuronosiltransferase (GumK) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 10, n. 3, 2014.

PAROUL, N. et al. Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 34, n. 3, 2011.

PARSA, P.; PAYDAYESH, A.; DAVACHI, S. M. Investigating the effect of tetracycline addition on nanocomposite hydrogels based on polyvinyl alcohol and chitosan nanoparticles for specific medical applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, 2019.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. **Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends**. *Thermochimica Acta. Anais...*2003

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF ChimeraX: Structure visualization for researchers, educators, and developers. **Protein Science**, v. 30, n. 1, p. 70–82, 2021.

PINHEIRO, B. B. et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 798–809, 2019a.

PINHEIRO, B. B. et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional

support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 798–809, 2019b.

POURMADADI, M. et al. The synthesis and characterization of double nanoemulsion for targeted Co-Delivery of 5-fluorouracil and curcumin using pH-sensitive agarose/chitosan nanocarrier. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102849, 2021.

RAMACHANDRAN, G.N.; RAMAKRISHNAN C.; SASISEKHARAN, V. Stereochemistry of Polypeptide Chain Conformations. **Journal of Molecular Biology**, v. 7, p. 95–99, 1963.

RANJBARI, N. et al. Improved features of a highly stable protease from *Penaeus vannamei* by immobilization on glutaraldehyde activated graphene oxide nanosheets. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 130, p. 564–572, 2019.

REIS, C. L. B. et al. **Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities** *Quimica Nova*, 2019.

RIOS, N. S. et al. Strategies of covalent immobilization of a recombinant *Candida antarctica* lipase B on pore-expanded SBA-15 and its application in the kinetic resolution of (R,S)-Phenylethyl acetate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 246–258, 1 nov. 2016.

RIOS, N. S. et al. Further stabilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* immobilized on octyl coated nanoparticles via chemical modification with bifunctional agents. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 141, p. 313–324, 2019a.

RIOS, N. S. et al. Increasing the enzyme loading capacity of porous supports by a layer-by-layer immobilization strategy using PEI as glue. **Catalysts**, v. 9, n. 7, 2019b.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, n. 0123456789, 2020.

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

SAEEDI GARAKANI, S. et al. Fabrication of chitosan/agarose scaffolds containing extracellular matrix for tissue engineering applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 143, p. 533–545, 2020.

SAHIN, S.; OZMEN, I. Covalent immobilization of trypsin on polyvinyl alcohol-coated magnetic nanoparticles activated with glutaraldehyde. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 184, p. 113195, 2020.

SCHLEPÜTZ, M. et al. Lipase-catalysed synthesis of ester oils from biodiesel by-products. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 3, 2008.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Streamlining design, engineering, and applications of enzymes for sustainable biocatalysis. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 9, n. 24, p. 8032–8052, 2021.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what

- and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.
- SINGH, R. et al. Electrical, optical and electrophotochemical studies on agarose based biopolymer electrolyte towards dye sensitized solar cell application. **Measurement: Journal of the International Measurement Confederation**, v. 102, p. 214–219, 2017.
- SOUZA, J. E. DA S. et al. A Comprehensive Review on the Use of Metal–Organic Frameworks (MOFs) Coupled with Enzymes as Biosensors. **Electrochem**, v. 3, n. 1, p. 89–113, 2022.
- SOUZA, J. E. S. et al. Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, 2020.
- SUN, S.; GUO, J.; CHEN, X. Biodiesel preparation from Semen Abutili (Abutilon theophrasti Medic.) seed oil using low-cost liquid lipase Eversa® transform 2.0 as a catalyst. **Industrial Crops and Products**, v. 169, n. May, p. 113643, 2021.
- TAHA, M. et al. Synthesis of novel derivatives of oxindole, their urease inhibition and molecular docking studies. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p. 3285–3289, 2015.
- TASLIMI, P. et al. The biological activities, molecular docking studies, and anticancer effects of 1-arylsulphonylpyrazole derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 9, p. 3336–3346, 2021.
- TIAN, W. et al. CASTp 3.0: Computed atlas of surface topography of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W363–W367, 2018.
- TRIVEDI, T. J.; KUMAR, A. Efficient Extraction of Agarose from Red Algae Using Ionic Liquids. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 04, n. 04, 2014.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, 2009.
- UGWUODO, C. J.; NWAGU, T. N. **Stabilizing enzymes by immobilization on bacterial spores: A review of literature** *International Journal of Biological Macromolecules* Elsevier B.V., , 2020.
- UNUGUL, T. et al. **Environmentally Friendly Processes from Coffee Wastes to Trimethylolpropane Esters to be Considered Biolubricants**. [s.l.] Taylor & Francis, 2020. v. 0
- URRUTIA, P. et al. Use of chitosan heterofunctionality for enzyme immobilization: β -galactosidase immobilization for galacto-oligosaccharide synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 116, p. 182–193, 2018.
- VAHIDI, M. et al. An organic solvent-tolerant lipase of *Streptomyces pratensis* MV1 with the potential application for enzymatic improvement of n6/n3 ratio in polyunsaturated fatty acids from fenugreek seed oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 58, n. 7, p. 2761–2772, 2021.
- VALÉRIO, R. B. R. et al. Understanding the biocatalytic potential of lipase from *Rhizopus chinensis*. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, v. 12, n. 3, p. 4230–4260, 2022.
- VARMA, R.; VASUDEVAN, S. Extraction, characterization, and antimicrobial activity

of chitosan from horse mussel modiolus modiolus. **ACS Omega**, v. 5, n. 32, 2020.

VERMA, M. L. et al. **Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications** *Environmental Chemistry Letters*, mar. 2020.

VILAS BÔAS, R. N. et al. Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: Lipase screening, reactor system development, and reaction optimization. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 168, 2021.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Desorption of lipases immobilized on octyl-agarose beads and coated with ionic polymers after thermal inactivation. Stronger adsorption of polymers/unfolded protein composites. **Molecules**, v. 22, n. 1, 2017.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. et al. Lecitase ultra: A phospholipase with great potential in biocatalysis. **Molecular Catalysis**, v. 473, n. April, p. 110405, 2019.

WAHAB, R. A. et al. On the taught new tricks of enzymes immobilization: An all-inclusive overview. **Reactive and Functional Polymers**, v. 152, n. February, p. 104613, 2020.

WANG, Y. et al. Oriented covalent immobilization of recombinant protein A on the glutaraldehyde activated agarose support. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 100–108, 2018.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative protein structure modeling using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 2016, 2016.

WU, L. et al. **Computer-aided understanding and engineering of enzymatic selectivity** *Biotechnology Advances*, 2022.

WU, X.; YANG, C.; GE, J. Green synthesis of enzyme/metal-organic framework composites with high stability in protein denaturing solvents. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 4, n. 1, p. 0–7, 2017.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, n. 7, p. 27–35, 2022.

ZAAK, H. et al. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 67–74, 2017.

ZHANG, D. H.; YUWEN, L. X.; PENG, L. J. **Parameters affecting the performance of immobilized enzyme** *Journal of Chemistry*, 2013.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, 2016.