



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA - UNILAB
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO - PROPPG
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL -
IEDS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE – PGEA**

VIVIANE DE CASTRO BIZERRA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0 EM HIDROGEL
DE TAMARINDO E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES:
BUTIRATO DE METILA E BUTIRATO DE ETILA**

REDENÇÃO – CE

2024

IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0 EM HIDROGEL DE
TAMARINDO E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES: BUTIRATO DE
METILA E BUTIRATO DE ETILA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PPGEAMB, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Energia e Ambiente.

Linha de Pesquisa 1: Processos Sustentáveis, Inovação e Difusão Tecnológica. **Subárea:** Processos Químicos.

Orientador(a): Prof. Dr^a. Maria Cristiane Martins de Souza.

Co-Orientador(a): Prof. Dr^a. Juliana de França Serpa.

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

Bizerra, Viviane de Castro.

B625i

Imobilização da lipase eversa® transform 2.0 em hidrogel de tamarindo e sua aplicação na síntese de ésteres: butirato de metila e butirato de etila / Viviane de Castro Bizerra. - Redenção, 2024. 98f: 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, 2024.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza.
Coorientador: Profa. Dra. Juliana de França Serpa.

1. Enzima - Eversa® transform 2.0. 2. Biocatalisador. 3. Imobilização. 4. Ésteres. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 660.634

VIVIANE DE CASTRO BIZERRA

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0 EM HIDROGEL
DE TAMARINDO E SUA APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES:
BUTIRATO DE METILA E BUTIRATO DE ETILA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente – PPGEAMB, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Energia e Ambiente.

Aprovada em: 31 / 10 / 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristiane Martins de Souza
Universidade da Integração da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)
(Orientadora)

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

Prof.^a Dr.^a Renata Chastinet Braga
Instituto Federal do Ceará (IFCE) – Unidade de Limoeiro do Norte

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

*A Deus, a minha mãe, as minhas
irmãs e ao meu amado esposo,
aos meus amigos e
companheiros de trajetória, os
quais eu tive a honra em tê-los
ao meu lado.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar sempre, por guiar, proteger e iluminar meu caminho, todas as decisões tomadas em minha vida até aqui foram graças à vontade dEle, sua infinita bondade e misericórdia sempre me levaram a lugares que nem eu mesma acreditava que conseguiria.

Ao meu esposo, Bruno França, por acreditar em mim e me apoiar nos dias que eu mesma julgava não ser capaz de prosseguir, assim como em meus votos de casamento, eu reafirmo o quanto sou feliz por tê-lo em minha vida, sua gentileza e amor me auxiliaram até aqui.

A minha mãe Gina, agradeço por seu esforço e perseverança ao educar a mim e minhas irmãs sozinha, todas as lutas e obstáculos ultrapassados fizeram de você um exemplo de mulher para mim. Agradeço as minhas irmãs, as quais fazem parte da minha primeira família, juntamente com minha mãe, por suas palavras de incentivo, sorrisos e felicidades compartilhadas, especialmente a minha irmã Ciciliane e Mariana, sou imensamente feliz por tê-las ao meu lado, esta será mais uma de nossas conquistas.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, Kaiany, Juliana e Valdilane, os quais nossos laços se fortaleceram com os dias de trabalho compartilhados, agradeço por todo apoio, incentivo, conselhos e as palavras gentis, vocês foram essenciais nesta caminhada, os momentos vivenciados serão sempre guardados em minha memória.

Aos demais colegas de trabalho do Laboratório de Biomassa, agradeço pelos momentos divertidos e a troca de experiências, meus mais sinceros agradecimentos, sem vocês a jornada não teria sido tão divertida e confortável.

A minha orientadora e Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristiane Martins de Souza, agradeço pela orientação, apoio e partilha de conhecimento, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Juliana de França Serpa, por todo o discernimento e a clareza ao me direcionar nos momentos oportunos, sua orientação me auxiliou para a construção desta pesquisa.

Aos professores Prof^ª. Dr^ª. Renata e Prof. Dr. José Cleiton, por terem aceitado o convite de participar da banca examinadora desta dissertação.

A mim, pelo esforço e dedicação durante todo o meu percurso acadêmico. Acreditar em mim mesma sempre será fundamental para alcançar os objetivos tão almejados.

*“É justamente a possibilidade
de realizar um sonho que torna
a vida interessante.”*

*Paulo Coelho
(O Alquimista)*

RESUMO

O estudo analisou a utilização do biocatalisador verde de hidrogel de tamarindo (TH) como suporte para imobilização enzimática da lipase Eversa® Transform 2.0 (ET2), utilizando gluataraldeído (GLU) como agente ativador, para a aplicação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. A imobilização com o biocatalisador de hidrogel de tamarindo em ET2 resultou na atividade enzimática do derivado de $82,26 \text{ Ug}^{-1}$ em 24 horas. Foram avaliadas algumas condições operacionais e os parâmetros de desempenho do biocatalisador para a síntese dos ésteres: concentração de substratos, razão molar (álcool:ácido), tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação (rpm) e estabilidade operacional. Com os resultados das melhores condições obtidas foi realizado o estudo de estabilidade operacional, nas condições de: temperatura de 25°C , em 150 rpm, em concentração molar de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas de reação de esterificação, todas as análises realizadas na presença do solvente orgânico hexano. O biocatalisador de TH/ET2 apresentou resultados satisfatórios para a síntese de ésteres butirato de metila e etila, atingindo melhores conversões, na análise de tempo em 4 horas, sendo de 90, 70% para butirato de metila e 90,05% para o butirato de etila, além de ter se mostrado estável mesmo após 30 ciclos consecutivos, com desempenho de reutilização em conversões de 88,38% para o butirato de metila e de 87,23% para butirato de etila. O novo biocatalisador TH/ET2/GLU se torna excelente para a produção de ésteres, sendo um promissor e inédito biocatalisador para outros estudos experimentais, com enzimas distintas e métodos adequados de imobilização.

Palavras-chave: Eversa® Transform 2.0. Biocatalisador. Imobilização. Ésteres.

ABSTRACT

The study analyzed the use of the green tamarind hydrogel biocatalyst (TH) as a support for enzymatic immobilization of the lipase Eversa® Transform 2.0 (ET2), using glutaraldehyde (GLU) as an activating agent, for application in the synthesis of methyl butyrate esters and ethyl butyrate. Immobilization with the tamarind hydrogel biocatalyst in ET2 resulted in the enzymatic activity of the derivative being 82.26 U_g-1 in 24 hours. Some operational conditions and performance parameters of the biocatalyst for the synthesis of esters were evaluated: substrate concentration, molar ratio (alcohol: acid), reaction time, temperature, stirring speed (rpm), and operational stability. With the results of the best conditions obtained, an operational stability study was carried out under conditions of temperature of 25°C, at 150 rpm, at a molar concentration of 0.2 mol/L, molar ratio of 1:5 for methyl butyrate and 1:3 for ethyl butyrate, during the 4 hours of esterification reaction, all analyzes carried out in the presence of the organic solvent hexane. The TH/ET2 biocatalyst presented satisfactory results for the synthesis of esters, methyl and ethyl butyrate, achieving better conversions, in the time analysis in 4 hours, being 90, 70% for methyl butyrate and 90.05% for ethyl butyrate, in addition to being stable even after 30 consecutive cycles, with reuse performance in conversions of 88.38% for methyl butyrate and 87.23% for ethyl butyrate. The new TH/ET2/GLU biocatalyst is excellent for the production of esters, being a promising and unpublished biocatalyst for other experimental studies, with different enzymes and suitable immobilization methods.

Keywords: Eversa® Transform 2.0. Biocatalyst. Immobilization. Esters.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da enzima Eversa Transform 2.0 selecionada do Protein Data Bank (PDB).....	21
Figura 2 - Representação do processo de ativação dos suportes com glutaraldeído (GLU) e a realização da imobilização enzimática.....	24
Figura 3 - Representação do processo de esterificação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila.....	31
Figura 4 - Representação da reação de esterificação para a formação de butirato de metila e butirato de etila utilizando a enzima lipase como biocatalisador.	32
Figura 5 - Fórmula química da reação de esterificação dos ésteres butirato de metila (A) e butirato de etila (B) utilizando a enzima lipase Eversa Transform 2.0 como biocatalisador.	32
Figura 6 - Etapas de produção do hidrogel de quitosana em laboratório.....	34
Figura 7 - Hidrogel de Tamarindo fornecido pelo Instituto Federal do Ceará – IFCE, Unidade de Limoeiro do Norte.....	35
Figura 8 - Principais etapas realizadas durante o desenvolvimento do trabalho.....	40
Figura 9 - Efeito da carga enzimática (A_t , U.g ⁻¹) na imobilização de CALB em CHI; CALB em TH e ET2 em CHI; ET2 em TH. Atividade do derivado (U.g ⁻¹) de CALB/CHI (■); CALB/TH (●); ET2/CHI (▼) e ET2/TH (▲). As linhas representam as tendências dos dados experimentais.	42
Figura 10 - Efeito da concentração de substratos na conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando <i>p</i> -NPB (Carga enzimática: 80 U _p NPB.g ⁻¹), a 25°C, 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L; 0,4 mol/L; 0,6 mol/L; 0,8 mol/L e 1,0 mol/L, em 8 horas de reação. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.	47
Figura 11 - Efeito da carga razão molar (álcool:ácido) na reação de esterificação para a produção dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. Perfil da variação de álcool (■) e de ácido (●) para butirato de metila. Perfil da variação de álcool (■) e de ácido (●) para butirato de etila. As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando <i>p</i> -NPB (Carga enzimática: 80 U _p NPB.g ⁻¹), a 25°C, 150 rpm, hexano, em 8 horas de reação, 1:5 (butirato de metila), 1:3 (butirato de etila). Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.	50
Figura 12 - Efeito do tempo de reação na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■), butirato de etila (■), butirato de metila – livre (●) e butirato de etila – livre (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada	

utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹), a 25°C, 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de reação. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.....53

Figura 13 - Efeito da temperatura na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹), em temperaturas de 15°C; 25°C; 35°C; 45°C e 50°C, 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.55

Figura 14 - Efeito da velocidade de agitação na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹), em temperaturas de 25°C, em agitação orbital de 50 rpm; 100 rpm; 150 rpm; 200 rpm e 250 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.58

Figura 15 - Estabilidade operacional na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹), em temperaturas de 25°C, em 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.60

Figura 16 - Atividade enzimática do derivado referente a recuperação do biocatalisador de Hidrogel de tamarindo e a enzima Eversa Transform 2.0 (TH/ET2) em 180 dias de armazenamento, sob refrigeração a 5°C.62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Melhores condições de imobilização dos suportes: Hidrogel Quitosana + CALB, Hidrogel Quitosana + EVERSA, Hidrogel de Tamarindo + CALB e Hidrogel de Tamarindo + EVERSA.....	42
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS GERAIS	17
1.1.1 Objetivos Específicos.....	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Lipases.....	18
2.2 Eversa® Transform 2.0 (ET2)	19
2.3 Imobilização enzimática	21
2.4 Hidrogel	25
2.5 Hidrogel de tamarindo	27
2.6 Butirato de metila e Butirato de etila.....	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Materiais	33
3.2 Métodos.....	33
3.2.1 Hidrogel de tamarindo (TH).....	33
3.2.2 Preparação do suporte de quitosana	34
3.2.3 Ativação dos suportes com glutaraldeído (GLU) – Hidrogel de tamarindo e hidrogéis de quitosana.....	35
3.2.4 Imobilização enzimática.....	35
3.2.5 Determinação da atividade enzimática.....	36
3.2.6 Parâmetros de imobilização	36
3.2.7 Síntese	37
3.2.8 Estabilidade operacional do derivado	38
3.2.9 Reuso do biocatalisador	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 Efeito do tempo de contato na imobilização enzimática	40
4.2 Efeito da concentração de substratos	45
4.3 Efeito da razão molar (álcool:ácido / ácido:álcool).....	48
4.4 Efeito do tempo de reação	51
4.5 Efeito da temperatura.....	54
4.6 Efeito da velocidade de agitação	57
4.7 Estabilidade operacional	59
4.8 Reuso do biocatalisador.....	62
4.9 CONCLUSÕES	63
5 REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

A biocatálise é definida como a modificação enzimática de substratos químicos a uma molécula alvo (CUTLAN *et al.*, 2020). De modo geral, o processo de biocatálise é estabelecido como um conjunto de reações que ocorrem simultaneamente, em que uma molécula indicadora pré-formada é convertida, aplicando células inteiras e/ou enzimas na reação, sejam elas de forma livres, combinadas ou imobilizadas (FORTI *et al.*, 2018). As vantagens da utilização da biocatálise abrangem: condições suaves de reações e alta especificidade, o que torna a biocatálise atraente em escala industrial, além de ser uma alternativa verde para a produção de biocatalisadores, quando comparados aos catalisadores convencionais, produzidos a partir da síntese quimio-catalítica, que fazem uso de solventes tóxicos e poluentes (GANTZ; ALEKU; HOLLFELDER, 2022)(PARDO-TAMAYO *et al.*, 2023).

Os biocatalisadores podem ser fungos, bactérias ou enzimas, sendo biodegradáveis e encontrados a partir de recursos renováveis (FAHIM *et al.*, 2024). O uso dos biocatalisadores é abrangente em estudos para a produção de biodiesel, especialmente utilizando enzimas lipases, isso se deve ao fato do uso das lipases contribuírem para a redução dos agentes oxidantes ou corrosivos, como hidróxido de potássio ou ácido sulfúrico (XU, YAMENG *et al.*, 2021) (CHANDRA *et al.*, 2020). A imobilização desses biocatalisadores tem sido notoriamente investigada em diversos âmbitos, isso porque o seu uso permite alguns benefícios, como a sua reutilização e a estabilidade térmica da reação(LV *et al.*, 2021). Durante a imobilização de biocatalisadores ocorre a transformação desse biocatalisador, que se encontra em estado solúvel, passando para o estado insolúvel, o qual incorpora junto ao material carreador insolúvel, ou encapsulando os catalisadores dentro de uma matriz polimérica, seja ela de origem natural ou sintética, o qual denomina-se como suporte (GRUNWALD, 2018) (RAMOS *et al.*, 2022).

A imobilização enzimática é definida como o aprisionamento, ou encapsulamento, da enzima em um determinado suporte, sendo este geralmente insolúvel em água(REMONATTO; MIOTTI JR.; *et al.*, 2022). A imobilização também permite a modificação e o aperfeiçoamento das propriedades das enzimas, eliminando a contaminação com o produto, além de melhorias de estabilidade e benefício no armazenamento(CAVALCANTE *et al.*, 2021). A característica de recuperação e reutilização do biocatalisador é uma das principais vantagens da imobilização enzimática,

além de melhorar a especificidade, os parâmetros cinéticos e atividade, bem como o benefício na purificação e hiperativação das enzimas (RODRIGUES, Rafael C. *et al.*, 2019). A imobilização é diretamente influenciada pelo tipo e as propriedades do suporte a ser utilizado, além da técnica escolhida de imobilização e os mecanismos de reação (SHELDON; VAN PELT, 2013) (BARBOSA *et al.*, 2013). Entre as principais enzimas a serem utilizadas em imobilização enzimática, destacam-se as enzimas lipases, a qual a estabilidade de armazenamento é superior quando comparado com a lipase livre, pois exibe atividade enzimática por longos períodos, além de beneficiar no aumento da temperatura e de rigidez, demonstrando ser ótimos biocatalisadores (MOKHTAR *et al.*, 2020).

As lipases são hidrolases que participam em ligações éster em ésteres carboxílicos, são enzimas versáteis e amplamente utilizadas, devido a alta seletividade, a atuação em condições de reações suaves, alta estabilidade em pH e em temperaturas elevadas, além de serem biocatalisadores importantes empregadas em reações em meios aquosos e não aquosos (CAVALCANTE *et al.*, 2021). A classe de enzimas lipases realizam, essencialmente, reações hidrolíticas enantiosseletivas, bem como a realização da catálise durante a formação de ligações amida e éster (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016a). A principal ativação interfacial das lipases ocorre em lipídio-água, o que destaca as lipases entre as demais enzimas (AMOAHA *et al.*, 2016). As lipases podem ser encontradas em organismos vivos, como em animais, em vegetais e em microorganismos (levedura, bactéria ou fungos) (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016a) (KOVALENKO *et al.*, 2021).

O uso dos hidrogéis como suportes para aplicação em imobilização enzimática já vem sendo estudado ao longo dos anos, entretanto, ainda é escasso trabalhos que evidenciem suportes de hidrogéis de origem natural. Hidrogéis a base de materiais naturais permite a melhor biodegradação e interações celulares inatas, quando comparados a hidrogéis sintéticos (DAS *et al.*, 2018). Os hidrogéis possuem expressivas características físico-químicas, como alta resistência, condutividade, elasticidade, adesividade e capacidade de memória de forma, além de resistência mecânica e alta tenacidade (ESIMBEKOVA *et al.*, 2023). São bastante utilizados na área biomédica, farmacêutica e engenharia (YANG, DAYONG, 2022).

Algumas diferenças podem ser exemplificadas entre o hidrogel e os géis, os géis são formados por redes tridimensionais a partir da reticulação de polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, que absorvem apenas uma parcela de líquidos, não necessariamente

sendo estes líquidos a água, mas podendo ser alguns outros solventes, alguns exemplos desses polímeros são a gelatina e a pectina, além de possuir consistência viscoelástica (CHELU; MUSUC, 2023; OSADA; PING GONG; TANAKA, 2004). Já o hidrogel, é composto majoritariamente por água e utilizam polímeros específicos, os quais permitem realizar ligações cruzadas, possuem como característica principal a capacidade de reter e liberar água facilmente (HO *et al.*, 2022; THANG; CHIEN; CUONG, 2023). De modo geral, os hidrogéis compõem uma subcategoria dos géis, em que todos os hidrogéis são géis, no entanto, alguns géis não se enquadram na categoria de hidrogéis (MISHRA, SUMIT *et al.*, 2018; MUSHTAQ *et al.*, 2022).

Os hidrogéis são redes tridimensionais (3D) moleculares reticuladas, em que estas redes são estabelecidas a partir de ligações covalentes ou interações não covalentes, como o emaranhamento físico ou interações hidrofóbicas, são polímeros e possuem a característica principal de reter quantidades expressivas de água (FERREIRA *et al.*, 2018). Alguns polímeros foram explorados com o objetivo de sintetizar hidrogéis, afim de obter propriedades relevantes, como polímeros sintéticos, como a poliacrilamida, e polímeros naturais, como polissacarídeos (YANG, DAYONG, 2022). O hidrogel se torna eficaz para a imobilização enzimática devido o fornecimento do microambiente adequado para as enzimas, pois para enzimas aplicadas a meios não aquosos esse tipo de suporte torna-se favorável, além de serem biodegradáveis, flexíveis, responsivos a estímulos e não são tóxicos (MEYER, JOHANNA; MEYER; KARA, 2022).

Os ésteres possuem aplicações em aromas e fragrâncias, tendo propriedades sensoriais relativamente agradáveis (PEREIRA *et al.*, 2022). Os ésteres butirato de metila e butirato de etila são obtidos a partir da reação de esterificação, a qual ocorre entre um ácido carboxílico e um álcool (DE HARO *et al.*, 2018). No presente trabalho é utilizado o ácido butírico que reage com os álcoois metanol e etanol, sendo catalisada por um biocatalisador de hidrogel enzimático, utilizando uma enzima lipase (SHI *et al.*, 2024) (MANTHA *et al.*, 2019). A imobilização da enzima em um suporte de hidrogel favorece um ambiente estável, o que beneficia em sua atividade enzimática, vida útil e a reutilização do biocatalisador, podendo ser operada em condições diversas, empregando um método sustentável para a produção de ésteres (DENG *et al.*, 2020) (DAS *et al.*, 2018).

É possível identificar que os hidrogéis são excelentes materiais de suporte para imobilizar diversas enzimas devido a sua biocompatibilidade, além de ser uma alternativa sustentável a ser considerada, podendo substituir os procedimentos quimicamente tóxicos utilizados, assim como seu uso é ecologicamente correto e economicamente viável. Neste

contexto, o objetivo do presente estudo foi analisar o biocatalisador de hidrogel de tamarindo, no processo de imobilização das enzimas lipases Eversa Tranform 2.0 (ET2) e CALB, comparando as atividades obtidas em um hidrogel de quitosana, para posterior viabilidade do biocatalisador de hidrogel de tamarindo como suporte enzimático, bem como as condições operacionais necessárias para a produção de dois ésteres, o butirato de metila e butirato de etila.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a imobilização da enzima Eversa Tranform 2.0 (ET2) em um suporte de hidrogel de tamarindo (TH) e avaliar as condições operacionais necessárias para produção de dois ésteres: butirato de metila e butirato de etila.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Analisar o biocatalisador de hidrogel de tamarindo e o seu comportamento na imobilização das enzimas: *Candida antártica* do tipo B (CALB) e Eversa Tranform 2.0 (ET2).
- Comprovar a eficácia do suporte TH/ET2 na imobilização da enzima Eversa Transform 2.0.
- Estudar as condições operacionais ideais para aplicação da esterificação de ésteres, sendo estas: concentração de substratos, razão molar, tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação (rpm) e estabilidade operacional.
- Avaliar o desempenho do biocatalisador de hidrogel de tamarindo na síntese de ésteres: butirato de metila e butirato de etila.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Lipases

Na busca por processos ecológicos de uma maior consciência ambiental e de saúde, estão sendo produzidos cada vez mais catalisadores verdes, os chamados biocatalisadores (FACIN *et al.*, 2021). As enzimas tem sido utilizadas em diversos âmbitos científicos para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas, com o objetivo de construir métodos eficazes a serem aplicados em bioprocessos de escala comercial, sendo esses processos sustentáveis e ambientalmente corretos (MONTEIRO *et al.*, 2021) (GERMANO DE SOUSA *et al.*, 2024). Para a produção desses biocatalisadores o uso da enzima lipase vem aumentando nos últimos anos, em particular nas áreas de síntese orgânica, aprimoramento de biocombustíveis e alimentícia (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016b).

As enzimas lipases, por sua capacidade de atuar como biocatalisadores versáteis em diferentes métodos científicos, podem ser aplicadas em uma variedade de reações e em diversas áreas (MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022). É vasta a capacidade das enzimas de converter uma variedade de substratos, é também retratada pelo potencial de catalisarem diferentes tipos de reações, o que beneficia quando empregadas em indústrias farmacêuticas, de detergentes, de bebidas, produtos de papel, de cosméticos, têxteis e dentre outras (ALNOCH *et al.*, 2020) (NETO *et al.*, 2023) (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

As enzimas lipases triacilglicerol hidrolases (EC 3.1.1.3) pertencem ao grupo hidrolases, possuem como característica principal a capacidade de catalisar a hidrólise de triacilglicerídeos em ácidos graxos livres, atuando em reações de esterificação, interesterificação, alcoólise e em reações de diversos outros ésteres, o seu sítio ativo é composto pela tríade catalítica de aspartato ou glutamato, histidina e serina, que auxiliam para desempenhos elevados de catálise (CASAS-GODOY *et al.*, 2012) (MOLINA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2021). Estas lipases realizam variadas bioconversões, isso porque possuem alta estabilidade, alta enantiosseletividade e regiosseletividade, além de especificidade de substratos (REMONATTO *et al.*, 2018) (CAVALCANTE *et al.*, 2022).

As enzimas lipases são consideradas catalisadores de origem biológica, capazes de responderem mesmo quando submetidas a situações de estresse (ORTIZ *et al.*, 2019). Mesmo com diversas vantagens, ainda é necessário a realização de aperfeiçoamentos em

alguns casos, para que sejam implementadas em indústrias (REETZ, 2013). As lipases são as enzimas mais amplamente empregadas em biocatálise, devido a sua heterogeneidade de aceitação de substratos distintos, são enzimas estáveis, podem ser aplicadas em meios aquosos, em meios que se encontram fluídos super críticos (DIAS, ARTHUR LUIZ BAIÃO; DOS SANTOS; MARTÍNEZ, 2018), líquidos iônicos (MEYER, LARS-ERIK; VON LANGERMANN; KRAGL, 2018) e em solventes orgânicos (KUMAR *et al.*, 2016), além de uma gama de outras possibilidades a serem inseridas em processos de biocatálise (SÁ *et al.*, 2017) (WU, SHUKE *et al.*, 2021).

2.2 Eversa® Transform 2.0 (ET2)

A Novozymes, uma das mais importantes empresas que produzem enzimas, lançou a lipase líquida Eversa® Transform (ET) e em 2016 lançou a segunda geração, denominada Eversa® Transform 2.0 (ET2), como é possível observar na figura 1, sendo estas uma formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus*, em que a ET e a ET2 foram utilizadas, inicialmente, com o objetivo de entrar no mercado de biocombustíveis, especialmente o biodiesel, em sua forma livre e em larga escala, posteriormente novas pesquisas foram sendo realizadas posteriormente novas pesquisas foram sendo realizadas (ALI *et al.*, 2023) (MONTEIRO *et al.*, 2021).

A ET2, derivada da *Thermomyces lanuginosus*, foi produzida a partir do processo de fermentação submersa de *Aspergillus oryzae*, por meio de uma cepa geneticamente modificada, se destacando por possuir alta atividade de esterificação de AGLs, assim como alta atividade de transesterificação de glicerídeos (MONTEIRO *et al.*, 2021) (FACIN *et al.*, 2021) (MIBIELLI *et al.*, 2019) (C. WANCURA *et al.*, 2020) (PRICE *et al.*, 2016) (FRAGA, FERNANDA CRISTINA *et al.*, 2019) (CHANG; CHAN; SONG, 2021).

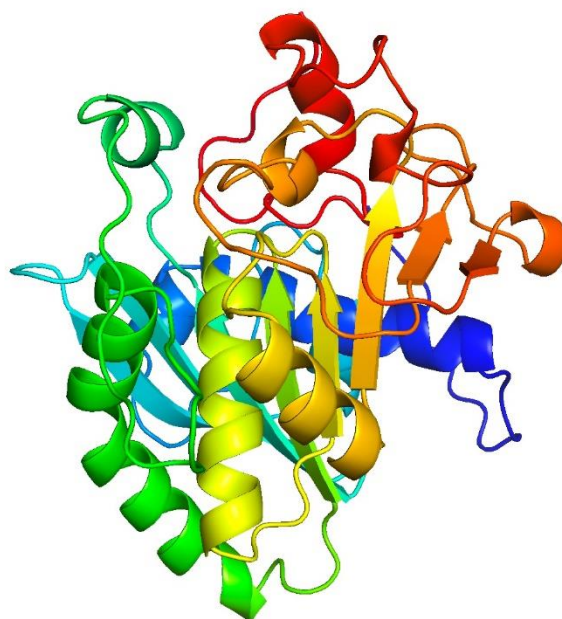
Além das lipases conseguirem hidrolisar triglicerídeos, são enzimas de interesse diverso em múltiplas de áreas de atuação, pois classificam-se como flexíveis em termos de aplicações, como também são estáveis em solventes orgânicos não aquosos e atuam em uma ampla rede de substratos (DAIHA *et al.*, 2015) (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018). As lipases são comumente encontradas em tecidos vegetais e de origem animal, além de serem produzidas por variados microrganismos, sendo estas bactérias, fungos e leveduras, podendo vir a exibir propriedades distintas, além de apresentarem elevada taxa de afinidade por interfaces hidrofóbicas (WILTSCHI *et al.*, 2020).

A principal fonte de produção de enzimas lipase são as microbianas, preferencialmente utilizadas industrialmente, pois as apresentam características diversas em suas propriedades catalíticas. Essas lipases podem ser frequentemente encontradas em ambientes marinho, em resíduos de óleos vegetais, em plantas, alimentos estragados, solos e dentre outros (FRAGA, JULY L. et al., 2021). As diferentes características que exibem as lipases estão diretamente relacionadas ao seu processo de produção e as condições nas quais foram submetidas, como a composição do meio de cultura em que se encontram os microrganismos, o período de cultivo, os valores de pH, a temperatura e dentre outros aspectos que devem ser considerados (HOU; SHIMADA, 2009).

As lipases realizam o processo de catalisar reações de hidrólise, que de forma geral é definida pela fragmentação de moléculas em moléculas menores estando na presença de água, as lipases catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (TAGs) que produzem ácidos graxos livres (AGLs), ou seja, as lipases catalisam a hidrólise de triacilglicerol a ácidos graxos, tendo como função realizar a hidrólise das ligações éster presentes nos triacilgliceróis a partir da água presente, também podendo ocorrer de forma contrária desde que o meio envolvido durante a ocorrência da reação apresente ausência de água, atuando assim na interface orgânica-aquosa (MILAŠINOVIĆ *et al.*, 2010) (PEREIRA *et al.*, 2022) (UNDERSTANDING THE BIOCATALYTIC POTENTIAL OF LIPASE FROM RHIZOPUS CHINENSIS, 2021).

Entretanto, o uso dessas lipases de forma livre em processos industriais se torna complexo, pois as lipases possuem baixa estabilidade ao serem submetidas a reações de períodos longos, assim como a redução gradativa de atividade durante os processos de armazenagem, resgatar e reaproveitar (OKURA *et al.*, 2020). A maior parte dessas limitações são aperfeiçoadas a partir da aplicação de técnicas de imobilização enzimática, trazendo melhorias significativas aos processos em que a enzima é submetida, podendo ser recuperada também para posterior reutilização (KAPOOR; GUPTA, 2012). A acessibilidade na reciclagem de enzimas e o melhoramento na estabilidade são fatores que influenciam diretamente nos processos industriais, isso porque é necessário compreender a viabilidade do uso de determinada enzima a ser aplicada, pois isso implica diretamente no custo do biocatalisador (DE ALMEIDA, JANAINA MARQUES *et al.*, 2018).

Figura 1. Estrutura tridimensional da enzima Eversa Transform 2.0 selecionada do Protein Data Bank (PDB).



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3 Imobilização enzimática

Na busca de construir materiais adequados para a aplicabilidade industrial, juntamente com as enzimas, biocatalisadores são criados a partir de fontes renováveis com o objetivo de melhorar a eficiência enzimática nos processos a serem aplicados (WU, Shuke *et al.*, 2021). A imobilização enzimática, juntamente com a tecnologia de bioprocessos, está em constante evolução devido à sua capacidade de permitir o uso diversificado de enzimas em vários tipos de biocatalisadores (FEDERSEL; MOODY; TAYLOR, 2021). Isso contribui para reduzir reações indesejadas e oferece vantagens em relação às enzimas livres, como a remoção fácil de misturas durante a reação, a possibilidade de reutilização após os processos e maior estabilidade (MAGHRABY *et al.*, 2023). A enzima imobilizada pode ser ligada a um material orgânico ou inorgânico, especialmente em suportes sólidos, o que proporciona uma maior resistência a mudanças, como a temperatura, pH e concentração (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; HOMAIEI *et al.*, 2013).

A imobilização enzimática define-se como um processo de fixação, ou confinamento, da enzima em um suporte sólido, ou matriz, o que permite a construção de um sistema enzimático imobilizado heterogêneo (HOMAEI *et al.*, 2013) (VAN DE VELDE *et al.*, 2002). Apesar dos custos elevados, em comparação aos catalisadores químicos convencionais, as enzimas imobilizadas possuem maior eficiência funcional e sensibilidade a condições submetidas durante os processos, tornando-se necessário estudar a enzima e o método a qual será submetida (CHEN, HUI *et al.*, 2020).

O suporte adequado a ser utilizado durante a imobilização enzimática deve conter algumas características, como: acessibilidade, a estabilidade, a resistência, possuir a capacidade de regenerabilidade, aumento da atividade enzimática e dentre outros aspectos (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013a). É válido constatar que as enzimas, os biocatalisadores, podem receber interferências do meio reacional, sendo passíveis a vulnerabilidades, como a desnaturação devido a presença de solventes orgânicos e a decorrência de danos ocorridos em seu sítio catalítico (ROBINSON, 2015) (WANG, SHIHUI *et al.*, 2016).

A imobilização enzimática permite que as enzimas sofram uma potencialização benéfica em suas capacidades catalíticas, o que resulta em melhorias em relação a desnaturação (NETO *et al.*, 2023). Determinados métodos são utilizados para ocorrer a imobilização enzimática, estando estes de acordo com a enzima a ser empregada, uma vez que são inúmeros os fatores que afetam o desempenho da enzima imobilizada, são quatro os métodos mais conhecidos: adsorção, aprisionamento (encapsulamento), ligação covalente e reticulação (CHERRY; FIDANTSEF, 2003; DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013a).

Além dos métodos citados anteriormente, alguns outros métodos são empregados para a imobilização enzimática, como a ligação covalente multiponto, encapsulamento e a formação de híbridos de nanopartículas magnéticas (REIS *et al.*, 2019). Os métodos a serem empregados podem ter suas vantagens e desvantagens, a depender de qual enzima será utilizada e em qual processo será aplicado, o que pode propiciar altas taxas de atividade enzimática ou até mesmo a ineficácia no desempenho da enzima (MOHAMAD *et al.*, 2015).

A imobilização enzimática traz diversas vantagens industriais e socioambientais, como o aumento da estabilidade operacional, melhor eficiência catalítica, a partir das enzimas imobilizadas, a fácil remoção do biocatalisador do meio reacional, a estabilidade térmica em temperaturas elevadas e, especialmente, a reutilização do biocatalisador, que

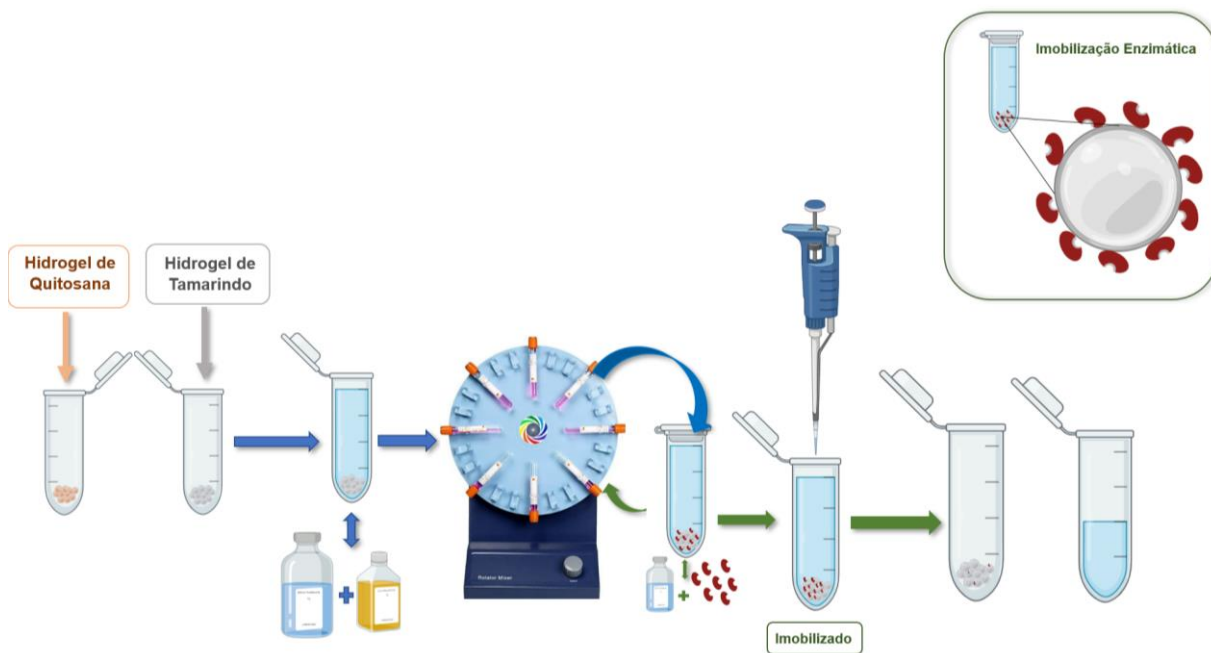
contribui para o aumento da produtividade (MENDES *et al.*, 2011). Existem também as condições a serem empregadas durante o processo de imobilização, que podem influenciar nas propriedades das enzimas imobilizadas, como o tipo de suporte que será utilizado e a natureza do solvente, podendo vir a serem modificadas para a aplicação em determinadas reações (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013b).

O principal objetivo da imobilização enzimática é reter a maior parte de sua atividade, e então a enzima imobilizada tem seu movimento restrito em uma determinada região (KOUACHI, 2012). A imobilização realiza a proteção das enzimas contra sua desativação e degradação, aumentando a estabilidade da enzima e a área de atividade, sendo popularmente utilizada em aplicações bioanalíticas e em biotransformações, fazendo com que a imobilização enzimática se torne um mecanismo poderoso e atrativo para a construção de designs de processos de produções mais sustentáveis e ecologicamente viáveis (AGGARWAL; PUNDIR, 2016).

Diversos são os estudos que identificam uma variedade de suportes naturais ou sintéticos, orgânicos ou inorgânicos, que tem sido promissores ao serem utilizados em imobilização, especialmente quando trata-se do uso de polímeros naturais, como os polissacarídeos. Estes apresentam características vantajosas que estes apresentam, como a biocompatibilidade, a capacidade de ser modificado e a não toxicidade (ATTIQUE *et al.*, 2023).

O método utilizado no presente estudo consiste na ligação covalente, que permite a ligação forte da enzima com o suporte, especialmente entre os grupos amina da enzima e os grupos do suporte a ser empregado, o que não permite a ocorrência de lixiviação e propicia uma maior estabilidade térmica e operacional da enzima no meio reacional (MOLINA-GUTIÉRREZ *et al.*, 2021). Para que as ligações entre enzima e suporte sejam realizadas, é necessário a modificação do suporte, ou ativação, e isto é realizado por meio de um reagente ativador, ou agente de reticulação, como o glutaraldeído, no caso do presente estudo, que possibilita a modificação da superfície do suporte, além de ser um reticulante funcional, o qual propicia a realização de ligações covalentes estáveis (WAHBA, 2023). Na figura 2 é possível observar a ilustração do processo de ativação dos suportes, de hidrogel de quitosana e hidrogel de tamarindo, com o agente ativador glutaraldeído (GLU), em seguida realizado o processo de imobilização enzimática das enzimas utilizadas no trabalho, ET2 e CALB.

Figura 2. Representação do processo de ativação dos suportes com glutaraldeído (GLU) e a realização da imobilização enzimática.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O glutaraldeído é um reagente que possui inúmeras vantagens quando aplicado na imobilização enzimática, sendo a principal delas a estabilidade da ligação que é formada entre o grupo amina e o grupo aldeído, presente na enzima e no suporte, após o suporte ser ativado com glutaraldeído, o que permite a manutenção da estrutura conformacional das enzimas (URRUTIA *et al.*, 2018) (FERREIRA GONÇALVES *et al.*, 2021) (REIS *et al.*, 2019). As ligações covalentes são formadas a partir dos grupos nucleofílicos, sendo eles: o grupo amino, fenólico, hidroxila, carboxila, tióis e sulfidril, os quais se encontram nos aminoácidos das enzimas, ou seja, durante as ligações covalentes os grupos funcionais se encontram ligados covalentemente a matriz do suporte utilizado (KAUR, KAMALJIT; KAUSHAL, 2019).

Os métodos aplicáveis para a imobilização enzimática já são amplamente recomendados, pois existem diversos estudos que comprovam o ótimo desempenho das mais variadas enzimas aplicadas aos métodos, em múltiplos suportes. Atualmente, existe uma maior atenção no que se refere ao uso de hidrogéis na imobilização enzimática, isso porque os hidrogéis já apresentam água em sua composição, não sendo necessário adicionar, o que para algumas enzimas presentes em ambientes não aquosos os hidrogéis se tornam necessários, pois estes podem proporcionar o microambiente conveniente para

estas enzimas (MEYER, JOHANNA; MEYER; KARA, 2022). Os hidrogéis que possuem biopolímeros em sua composição, os quais são polímeros produzidos a partir de fontes naturais, que passam por reações sintetizadas quimicamente (SMITH; MOXON; MORRIS, 2016), estão sendo estudados como suportes para imobilização de lipase, seu uso se estende a diversos setores, como em aplicações biotecnológicas e em aplicações biomédicas (PARK *et al.*, 2015).

2.4 Hidrogel

Os hidrogéis são classificados como materiais poliméricos hidratados, formados por uma rede tridimensional porosa produzida a partir de polímeros hidrofílicos reticulados, além de serem reticulados a partir de ligações físicas ou químicas, são materiais insolúveis em água ou em outros solventes polares (SCHMIDT, 2019)(JHA *et al.*, 2023). Os hidrogéis possuem capacidade de absorção de quantidades consideráveis de líquidos, o que faz com que realize o aumento de volume do material, conhecido popularmente como “inchaço” (MILAŠINOVIĆ *et al.*, 2010) (SHARMA; PARMAR; MEHTA, 2018).

Os hidrogéis possuem como principal característica a capacidade de reformular sua estrutura quando estando em contato com água ou fluídos biológicos, o microambiente de catálise enzimática pode ser substituído pela matriz de hidrogel hidratada, o que favorece toda a imobilização das enzimas inseridas no suporte, pois aumenta a flexibilidade, bem como a mobilidade, o que afeta significativamente a atividade enzimática (REIS *et al.*, 2019) (AHMED, 2015). Os hidrogéis possuem duas categorias distintas, as quais são classificadas de acordo com a resposta a estímulos externos, são eles os denominados hidrogéis estáticos, os quais mantem estabilidade tanto nas propriedades físicas quanto químicas, quando submetidos a condições diversas, já os hidrogéis denominados dinâmicos são responsáveis por responderem uma ampla gama de estímulos externos, sendo o mais atraente (LIN *et al.*, 2021; XU, JUNPENG; WONG; HSU, 2020)

Os hidrogéis são construídos por meio de distintas ligações cruzadas, são polímeros biocompatíveis, podendo ser reformulados para se tornarem inteligentes, modificando sua estrutura química, alterando os métodos de fabricação, bem como a morfologia, para que possam atender demandas específicas de diversos setores, especialmente no setor de engenharia e da biomedicina (MEHTA *et al.*, 2021)

(STANCIU; DIAZ-AMAYA, 2022). A quantidade de água presente nos hidrogéis se devem ao fato da forte tensão superficial e forças capilares presentes, são considerados biodegradáveis, ecológicos e biocompatíveis, sendo suas propriedades diretamente dependentes da densidade de reticulação, do tempo e da temperatura da reação e dentre outros (ISLAM; OYEN, 2022).

O hidrogel também é conhecido como géis hidrofílicos, geralmente são encontrados na forma de géis coloidais, em que a água se encontra como meio principal de dispersão (ZAINAL *et al.*, 2021) (AHMED, 2015). Eles possuem a capacidade de absorver a água apoiado nos grupos funcionais hidrofílicos, os quais podem ser carboxila, hidroxila, amida e amino, que se encontram ligados a estrutura de cadeias poliméricas principais, o que é realizado no espaço intermolecular devido as taxas elevadas de hidrofobicidade, bem como a alta porosidade. Já o impedimento de não dissolver na presença de água surge com as ligações cruzadas entre as cadeias de rede, a reticulação que existe entre as cadeias impedem o deslocamento das moléculas de água maiores, do que os poros da rede tridimensional, o que preserva a estrutura do material em hidrogel, em que muitos materiais, sejam eles sintéticos ou naturais, se encaixam na definição (YANG, XUE *et al.*, 2022).

Todas as funções dos hidrogéis são dependentes das rotas de fabricação dele, da composição do polímero, o modo de realização da reticulação, do ambiente externo e dentre outros aspectos, o que pode promover a flexibilidade de ajustes amplos (ZHANG, QIANG, 2022) (YAVARI MAROUFI *et al.*, 2021). A função primordial do hidrogel é manter a interação entre célula-célula e a imobilização celular, assim como a absorção de proteínas, todas dentro da sua microestrutura (RANJIT *et al.*, 2022).

De modo geral, os hidrogéis podem ser criados a partir de combinações de processos diversos, além de serem sensíveis ao ambiente, podendo sofrer alterações físico-químicas significativas, quando expostos a luz, pressão, temperatura ou pH distintos. A força elétrica, também presente, é fortemente ajustada para a ligações de átomos, formando uma matriz polimérica complexa, é adaptável, resistentes a trações, é aplicável em indústrias médicas, como na produção de lentes de contato, na engenharia de tecidos, em biossensores e dentre outros (SHAFIQ *et al.*, 2022).

Para a preparação dos hidrogéis à base de polímeros naturais é possível utilizar os métodos de reticulação físicos ou químicos, os mais recomendados são os métodos químicos, entretanto, mesmo a reticulação física não se tornando viável, devido a baixa resistência ao hidrogel, existem estudos que a utilizaram associados a outros polímeros,

sejam eles naturais ou sintéticos, tendo tido bons resultados (SANNINO; DEMITRI; MADAGHIELE, 2009) (SHAW *et al.*, 2015; TRIVEDI, 2013).

A diferença entre hidrogel e géis pode ser explicado pelo fato do hidrogel ser uma rede de polímeros hidrofílicos, os quais podem ser reticulados de duas formas: através do emaranhamento físico, chamado também de hidrogel reversível, ou a partir de ligações covalentes, chamado de hidrogel permanente. No entanto, um gel é classificado como um semissólido de polímeros hidrofílicos, ou também constituído por polímeros hidrofóbicos, o qual é um material que possui quantidades significativas de líquidos assim como de sólidos presentes, mas os hidrogéis são compostos significativamente por água presente em sua estrutura (LI, DE-QIANG *et al.*, 2023).

A reticulação química atualmente tem sido a mais viável escolha, entretanto ainda existe estudos que comprovam que a maioria dos agentes de reticulação utilizados são considerados tóxicos, devido a isso outros estudos vêm sendo realizados utilizando agentes de reticulação não tóxico e com melhor custo benefício, como o ácido cítrico (MALI; DHAWALE; DIAS, 2017). Os hidrogéis a base de polissacarídeos, devido a sua rede tridimensional integrada com moléculas de água, permite uma maior adesão, já os polissacarídeos naturais possuem propriedades como bioadesividade, biodegradabilidade e biocompatibilidade além de possuírem uma tolerância ao congelamento, o que permite que os hidrogéis protejam competentemente a atividade enzimática, sendo os hidrogéis muito eficazes na proteção de alimentos (AVACHAT; SHROTRIYA, 2022) (KIM *et al.*, 2012).

2.5 Hidrogel de tamarindo

A matéria-prima utilizada no presente trabalho trata-se do hidrogel de tamarindo, o qual foi produzido a partir do fruto tamarindo, considerado um componente natural, renovável e biodegradável. A árvore de tamarindo (*Tamarindus indica* Linn.), a qual é composta por folhas, polpa e sementes, é encontrada preferencialmente no sul da Índia, mas também no México, Tailândia, Oriente Médio e Sudeste Asiático, sendo uma planta versátil, utilizada como tempero na culinária asiática, assim como nas indústrias alimentícia, farmacêutica, têxtil e de combustíveis (SAIDSWARA RAO; MARY MATHEW, 2012) (AZAD, 2018).

O fruto da tamarindo possui polpa e sementes, quando a fruta encontra-se seca os principais componentes presentes são o ácido tartárico, celulose, tanino, açúcares,

pectina e fibras, ambas são fontes de fósforo, cálcio, potássio, ferro e zinco, além da semente ser muito rica em proteínas e óleos (AZAD, 2018). Quando as sementes se encontram inteiras, as propriedades também incluem, carboidratos, proteínas e gorduras (LEAKEY, 2017). O extrato de semente de tamarindo (TSE) é utilizado em diversos meios, alguns deles como a preparação de hidratantes, máscaras, formulações farmacológicas, soros e géis (SAIDESWARA RAO; MARY MATHEW, 2012; SARMA; BABU; AZIZ, 2014).

Os componentes presentes na árvore, como os frutos, cascas, raízes, folhas e a madeira, são contribuintes para aplicações industriais em diferentes finalidades, como sendo a principal matéria-prima na produção de suco, pó do caroço de tamarindo (TPK), pectina, ácido tartárico e dentre outros (PERVEZ; RAJKUMAR; OLABIYI, 2023). O pó do caroço de tamarindo (TKP) é bastante aplicado nos processos de preparação de adesivo de papel, conservantes, impressão têxtil, fabricação de tecidos de juta e em vários outros processos da indústria têxtil (HEMSHEKHAR; KEMPARAJU; GIRISH, 2011).

A goma de tamarindo (TG), também conhecido como polissacarídeo de semente de tamarindo (TSP) ou como goma polissacarídica de tamarindo (TPS), possui várias aplicações no campo biomédico, sendo passíveis de modificações, como combinados com outros polímeros naturais e sintéticos (AVACHAT; SHROTRIYA, 2022). Alguns pontos devem ser destacados acerca da goma de tamarindo (TG), apesar de ser flexível e poder ser utilizada em uma ampla gama de áreas, o odor da goma pode se tornar incômodo, sua cor também é opaca, além da sua insolubilidade em água, o que permitiu que fossem realizados estudos químicos mais aprofundados entre os grupos funcionais para superar tais limitações, como a acetilação, sulfatação, aminação e tiolização, utilizados para aperfeiçoar suas características (GARNER; PARK, 2015; KAUR, GURPREET; MAHAJAN; BASSI, 2013; PRABHANJAN, 1989; RAO; BERI, 1955).

A goma de tamarindo (TG) se apresenta, na maioria das vezes, como um gel rígido, é bastante acessível e é utilizado para melhorar a textura de alimentos processados, também utilizado para gelificar e espessar esses alimentos processados industrialmente (SARMA; BABU; AZIZ, 2014). A procura de grupos funcionais de polissacarídeos naturais despertam o interesse de diversos pesquisadores, a exploração na modificação química vem sendo bastante utilizada, pois possibilita as alterações em algumas propriedades, como viscosidade, solubilidade e a degradação (WANG, DANGFENG et al., 2023a) (LANG *et al.*, 1992). Foi analisado que a semente da fruta de tamarindo apresenta cerca de 65% de sua composição sendo goma, sendo possível extrair a goma de

tamarindo (TG), quando é realizado a funcionalização da goma é possível obter o aprimorando das propriedades físico-químicas (MALI; DHAWALE; DIAS, 2019).

O TG é considerado um subproduto verde, ou seja, é um produto natural e sustentável derivado da indústria do tamarindo. Devido a biodegradação rápida é necessário a realização de transformações químicas em suas propriedades, como a carboximetilação, que modifica TG para a goma de tamarindo carboximetilada (CMTG), estas modificações são necessárias para melhorar as propriedades do TG (RAWOOTH *et al.*, 2022). A carboximetilação do TG permite a formação da goma de tamarindo carboximetil (CMTG), sendo o CMTG com altas taxas de viscosidade e hidrofilicidade, podendo ser alteradas a depender das condições nas quais foram realizadas as modificações, sendo uma versão aprimorada do TG, que pode ser utilizada em uma ampla gama de aplicações industriais e farmacêuticas (GHOLAMALI; YADOLLAHI, 2021).

O hidrogel de tamarindo é composto principalmente pela goma de tamarindo (TG), na qual é uma goma natural coletada do cotilédono das sementes de tamarindo (*Tamarindus indica*). A semente de tamarindo é composta por diversos polissacarídeos, sendo os principais o galactomanano, xiloglucano e arabinogalactano, também presentes no TG, esses polissacarídeos são responsáveis pelas propriedades espessantes, gelificantes e estabilizante em diversas aplicações (WANG, DANGFENG *et al.*, 2023) (SINGH, VANDANA; KUMAR, 2011). O TG é insolúvel em solventes orgânicos, possui facilidade de dispersão e hidratação em água morna, realizando a formulação de géis viscosos, o constituinte principal é o galactomanano, contribuindo para a formação de hidrogéis (BALAKRISHNAN *et al.*, 2024).

2.6 Butirato de metila e Butirato de etila

A produção de ésteres é significativamente importante para as indústrias, especialmente na produção de aromas na indústria alimentícia e fragrâncias no setor de perfumes, cosméticas, em produtos farmacêuticos, pesticidas, para solventes de tintas e vernizes, plastificantes e de bebidas (OZYILMAZ; GEZER, 2010). Ésteres se enquadram no grupo de aditivos de intensificadores de sabor, possuindo características organolépticas que caracterizam se o aroma é picante, floral ou frutado, além de uma ampla variedade de aplicações (BADGUJAR; BHANAGE, 2015). A síntese atual desses ésteres utiliza ácidos líquidos como catalisadores e ainda precisam realizar um pós-tratamento ao final da reação, em sua maioria não sendo rotas sustentáveis. Atualmente,

já existem rotas alternativas sendo desenvolvidas, especialmente com o uso de enzimas como biocatalisadores(BEN SALAH *et al.*, 2007) (KAUR, MANPREET; MEHTA; GUPTA, 2019).

Os ésteres fazem parte da classe de compostos orgânicos que podem reagir com água, o que permite a produção de ácidos orgânicos, inorgânicos e álcoois(CLARK, 2002). Um éster é formado pela reação entre ácidos carboxílicos e álcoois, quando estão na presença de ácido sulfúrico, o mais conhecido, ou ácido butírico, o qual é utilizado no presente estudo, o que permite a formação do processo denominado esterificação, em que, geralmente, ocorrem em fase líquida e incolor, devido a versatilidade da utilização em processos industriais (GROB; HASSE, 2006). Os ésteres também são convertidos em outros ésteres, quando este se encontra na presença de um álcool, um ácido carboxílico e um outro éster, no processo que denomina-se transesterificação (DANGE; SHARMA; RATHOD, 2014).

A reação de esterificação, devido a acidez fraca dos ácidos carboxílicos, pode ser realizada sem a presença de um catalisador, mas a reação se torna lenta e prolongada, atingindo um equilíbrio tardio (WANG *et al.*, 2013). Ao ser realizada com um catalisador ácido, sólido e heterogêneo, bem como com um reagente em excesso, a conversão do reagente limitante é melhor desenvolvida e o equilíbrio da reação é atingido mais rapidamente (KOVALENKO *et al.*, 2021). A figura 3 é demonstrado as etapas que ocorreram o processo de esterificação para a produção dos ésteres butirato de metila e butirato de etila, em seguida realizado a etapa de titulação utilizando fenolftaleína, para posteriormente realizar os cálculos de conversões obtidos durante as análises dos ésteres.

Figura 3. Representação do processo de esterificação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila.

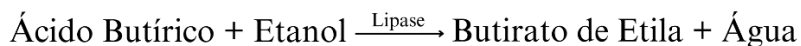


Fonte: Elaborado pelo autor.

Industrialmente, a síntese desses ésteres é, em sua maioria, baseada na esterificação química direta dos ácidos graxos com álcool, frequentemente utilizando catalisadores inorgânicos em pressão e em temperaturas elevadas, variando entre de 50°C a 250°, o que geram gastos e períodos elevados de produção (OZYILMAZ; GEZER, 2010). Devido a estes desgastes, o uso de enzimas e biocatalisadores ecológicos tem se tornado objeto de interesse comercial (FRIEDRICH *et al.*, 2013). São necessários alguns parâmetros para que a comercialização desses ésteres, construídos a partir de biocatalisadores heterogêneos e sustentáveis, seja viável, tais como: atividade enzimática, o rendimento de conversão do éster e a estabilidade operacional, sendo esta última de suma importância para a produtividade industrial (KOVALENKO *et al.*, 2021).

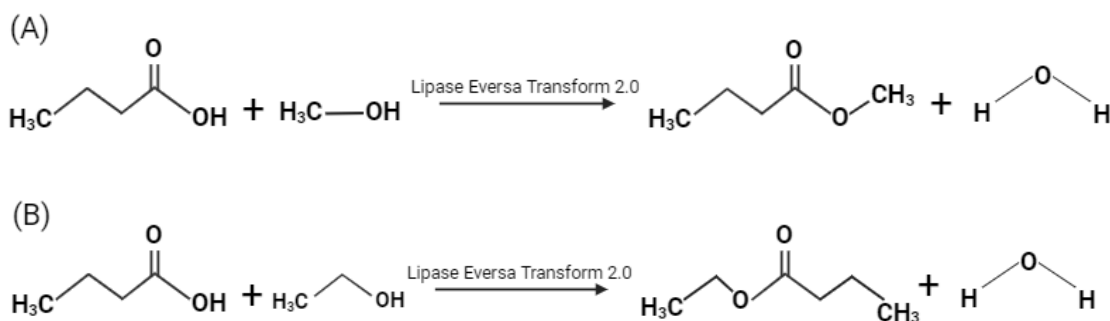
O éster metílico do ácido butírico, ou butirato de metila, possui aroma de frutas e relativamente forte, semelhante a fruta de abacaxi. O butirato de metila está presente em quantidades baixas em produtos de origem vegetal, além de ser fabricado, mesmo que em pequena escala, em perfumarias ou como aromatizante alimentar (DANGE; KULKARNI; RATHOD, 2015) (DANGE; SHARMA; RATHOD, 2014). Similarmente, o éster etílico do ácido butírico, ou butirato de etila, também é responsável por um aroma frutado doce, muito empregada em perfumes e alimentos (DIAS *et al.*, 1991) (FRIEDRICH *et al.*, 2013). Ambos podem ser obtidos através da reação de esterificação entre o ácido butírico e os álcoois, metanol e etanol, como apresentado na figura 4 e figura 5.

Figura 4. Representação da reação de esterificação para a formação de butirato de metila e butirato de etila utilizando a enzima lipase como biocatalisador.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5. Fórmula química da reação de esterificação dos ésteres butirato de metila (A) e butirato de etila (B) utilizando a enzima lipase Eversa Transform 2.0 como biocatalisador.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas reações de esterificação utilizando um biocatalisador enzimático, como a lipase, é possível favorecer as conversões dos reagentes em produtos, devido a remoção da água formada, ocorrendo o deslocamento do equilíbrio em direção à formação dos ésteres, podendo ocorrer em condições diversas de temperatura ou pH, sendo vantajoso quando comparados a catalisadores químicos tradicionais (PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2009) (DIAS et al., 1991).

Ambos os ésteres podem se comportar do mesmo modo em reações enzimáticas, havendo ligeiras modificações devido aos grupos reacionais serem distintos (KAUR; MEHTA; GUPTA, 2019). Além de ser uma reação reversível, as reações de esterificação em junção a biocatalisadores enzimáticos, especialmente as lipases, as quais podem catalisar reações de esterificação e hidrólise, dependendo apenas da otimização das condições ideais da reação, contribuindo para a formação de ésteres eficazes (SHU *et al.*, 2011) (PALUDO *et al.*, 2015). Embora exista diversos estudos disponíveis na literatura

sobre a esterificação de variados ácidos orgânicos, ainda é escasso informações disponíveis sobre a síntese de butirato de metila e/ou etila a partir de ácido butírico, na presença de biocatalisadores enzimáticos(SÁ *et al.*, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

A lipase Eversa® Transform 2.0 (ET2) foi adquirida da Novozymes Latin America Ltda (Araucária – PR, Brasil) e a lipase de *Candida antártica* do tipo B (CALB) foi adquirida da Novozymes Latin America Ltda (Araucária – PR, Brasil). O hidrogel de tamarindo (*Tamarindus indica*) foi gentilmente fornecido a partir da parceria entre a UNILAB e o Instituto Federal do Ceará – IFCE, Unidade de Limoeiro do Norte. A quitosana (CHI) em pó foi adquirida da Polymar Ind Ltda (Fortaleza – CE, Brasil). A solução de glutaraldeído (GLU) grau II 25% (m/v), butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) e *p*-nitrofenila (*p*NP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo – SP, Brasil). Os demais reagentes utilizados são de grau analítico e foram adquiridos da distribuidora Cequímica (Fortaleza - CE, Brasil).

3.2 Métodos

3.2.1 Hidrogel de tamarindo (TH)

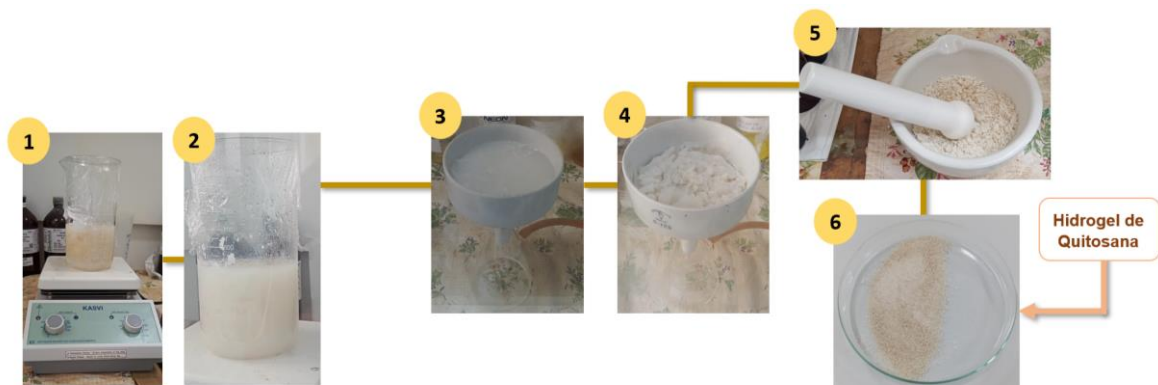
Inicialmente foram enviados três tubos de hidrogel de tamarindo (*Tamarindus indica*) pelo Instituto Federal do Ceará – IFCE, Unidade de Limoeiro do Norte, preparados baseados nos estudos de (TEIXEIRA *et al.*, 2007; TEIXEIRA-SÁ *et al.*, 2009) (MISHRA, ANURADHA; MALHOTRA, 2009) (SANTOS, NAYANNE L. *et al.*, 2019). Os dois primeiros tubos recebidos tratavam-se do hidrogel de tamarindo em polissacarídeo reticulado, já o terceiro tubo foi enviado na forma de hidrogel purificado, estando codificados de formas distintas mas não havendo alterações entre as composições e/ou formulações, sendo aquecido as sementes e extraído o polissacarídeo

galactoxiloglucano para a produção do hidrogel. Os dois primeiros tubos foram lavados com excesso de água destilada e transferidos para o dessecador, contendo sílica gel, para a retirada da umidade, após secos, os hidrogéis foram pesados e armazenados. O terceiro tubo, já purificado e seco, foi apenas pesado e armazenado.

3.2.2 Preparação do suporte de quitosana

O gel de quitosana foi preparado semelhante as metodologias de (PINHEIRO *et al.*, 2019) (KIMBERLE *et al.*, 2020) (RODRIGUES, DASCIANA S. *et al.*, 2008) (ADRIANO *et al.*, 2005). Foram utilizados 10g de quitosana em pó, dissolvidas em 240mL da solução de ácido acético glacial a 5% (v/v). A solução adquirida foi adicionada lentamente à 250mL da solução de NaOH 1M e colocada no agitador magnético por 24 horas, a 25°C e em 50rpm. A solução obtida após as 24 horas de agitação continha grânulos (géis) e foi armazenada em refrigeração. Após 24 h, foi realizado a filtração a vácuo e a lavagem do suporte com água destilada para atingir a neutralidade (pH 7). Depois de filtrado e seco, os grânulos restantes foram macerados e deixados no aspecto de pó. Por fim, o suporte de hidrogel de quitosana obtido foi colocado no dessecador. A figura 6 apresenta as etapas de produção do hidrogel de quitosana, utilizando a quitosana em pó comercialmente vendida, para a obtenção dos grânulos de hidrogel, os quais foram neutralizados e deixados no dessecador, a fim de eliminar toda umidade presente, até se encontrar no aspecto de pó, para facilitar o processo de pesagem durante as análises.

Figura 6. Etapas de produção do hidrogel de quitosana em laboratório.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.3 Ativação dos suportes com glutaraldeído (GLU) – Hidrogel de tamarindo e hidrogéis de quitosana

A ativação dos suportes antes da realização da imobilização enzimática é necessária para a construção das ligações covalentes entre suporte e enzima (GERMANO DE SOUSA, I. et al., 2024; GERMANO DE SOUSA, I., 2022). As ativações com glutaraldeído (GLU) ocorreram semelhante a metodologia de Pinheiro et al. (2019) com algumas modificações. Foram pesados (0,1g) de cada suporte seco (hidrogel de tamarindo / hidrogel de quitosana), com ativações individuais para cada suporte, foram adicionados 1mL de tampão fosfato de sódio 100 mmol.L⁻¹ (pH 7) e em seguida adicionados 5μL de glutaraldeído (GLU) 5% (v/v). As reações foram mantidas sob agitação contínua, no carrossel giratório, por 1 hora a 25°C. Os suportes ativados foram lavados com 2mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7) cada, para a remoção do excesso do agente ativador. Por fim, os dois suportes ativados foram colocados no dessecador pelo período de 4 dias. A figura 7 apresenta o hidrogel de tamarindo antes de serem realizadas as análises com o material.

Figura 7. Hidrogel de Tamarindo fornecido pelo Instituto Federal do Ceará – IFCE, Unidade de Limoeiro do Norte.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.4 Imobilização enzimática

O processo de imobilização foi realizado a partir do contato de 0,01g de cada suporte ativado (hidrogel de tamarindo + GLU / hidrogel de quitosana + GLU) para a realização da imobilização enzimática separadamente, com o objetivo de analisar o comportamento de cada suporte, imobilizados com a enzima Eversa® e imobilizados com

a enzima CALB, além de qual suporte e qual enzima seria o mais adequado para a continuação do estudo. Foram adicionados aos suportes pesados 1mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7), 80 UpNPB.g⁻¹ de carga enzimática (ET2/CALB) e foi colocado sob agitação constante, a 45 rpm e a 25°C, pelos períodos de contato entre enzima-suporte de: 1 hora, 5 horas, 24 horas, 48 horas e 72 horas. As enzimas imobilizadas em cada suporte foram separadas da solução. Por fim, o derivado foi lavado em 1mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7) e preparado para a realização da leitura das enzimas solúveis e imobilizadas.

3.2.5 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática (80 UpNPB.g⁻¹ suporte) foi determinada conforme as metodologias de PINHEIRO et al. (2019) e DOS SANTOS, J. C.S. et al. (2017), com algumas modificações. Foi utilizado butirato de p-nitrofenol (pNPB), em pH 7, como solução de substrato. A reação foi preparada adicionando 50 µL de *p*-NPB em 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mmol.L⁻¹ (pH 7), 50 µL da amostra imobilizada, ou 10mg de suporte imobilizado (biocatalisador), a 25 °C e em agitação. O produto liberado da reação, *p*-nitrofenol, foi analisado espectrofotometricamente, utilizando um espectrofotômetro Jasco V-730 BIO, no comprimento de onda de 348 nm ($\epsilon = 10,052 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade (U) é determinada como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de *p*-NPB por minuto, de acordo com as condições descritas previamente (SOUZA, M. C. M., 2013; SOUZA, M. C. M. de et al., 2017).

3.2.6 Parâmetros de imobilização

A determinação da atividade enzimática ET2 e CALB, imobilizadas em hidrogel de tamarindo e em hidrogel de quitosana, ocorreu através dos cálculos de concentrações iniciais e finais das enzimas presentes no sobrenadante de imobilização. Foram determinados, também, as atividades hidrolíticas, para definir o cálculo dos parâmetros de imobilização: rendimento de imobilização (*R*), atividade teórica (*At_t*) e atividade recuperada (*A_{tr}*) (SOUZA, M. C. M., 2013), em que foram utilizadas especialmente a equação 1 e equação 2 no estudo. Na equação 1 foi calculado a atividade recuperada *A_{tr}* (atividade do derivado), em que abs é o valor da absorbância verificado no

espectrofotômetro, f é o fator de correção da curva de calibração do pNPB, V_u é o volume utilizado na leitura do derivado (suporte + enzima) e v é o volume utilizado para a imobilização (0,01mL).

Eq. (1):

$$Atr(Ug^{-1}) = \frac{(abs \times f(0,175)) \times Vu(26mL)}{v(0,01mL)}$$

Eq. (2):

$$R(\%) = \frac{(Att - Atr)}{Att} \times 100$$

A equação 2 representa o cálculo de rendimento de imobilização, em que a atividade teórica (Att) é definida como a concentração de enzimas presentes no sobrenadante antes da imobilização, e após a imobilização é a atividade recuperada (Atr), ou a atividade enzimática do derivado imobilizado em Ug^{-1} . Ou seja, o cálculo de rendimento demonstra que a atividade recuperada é a razão entre a atividade teórica, obtida antes da imobilização, e a diferença entre a atividade teórica, presente no sobrenadante, antes e depois da realização da imobilização enzimática, enfatizando que a atividade recuperada é entendida como a eficiência do suporte (biocatalisador) utilizado (RODRIGUES, DASCIANA S. et al., 2008) (ADRIANO et al., 2005).

3.2.7 Síntese

Em micro tubos de plástico de 2mL foram adicionados 0,01g de hidrogel de tamarindo + ET2 + 1mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7) (atividade enzimática de 80 UpNPB.g⁻¹), após a imobilização em 24 horas e em 45rpm, os tubos foram lavados com 1mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7), deixando apenas o derivado (suporte + enzima). O procedimento de esterificação foi realizado, inicialmente mantendo o padrão do melhor resultado descrito por (SOUZA, M. C. M., 2013). Nos microtubos contendo o derivado (suporte + enzima), foram adicionados 1mL do meio reacional composto por: hexano, ácido butírico e os álcoois (etanol e metanol) em diferentes concentrações (0,2 mol/L; 0,4 mol/L; 0,6 mol/L; 0,8 mol/L e 1,0 mol/L) e razão molar (1:1 – 1:5). A reação foi conduzida em parâmetros distintos, nos tempos de 2 horas; 4 horas; 6 horas; 8 horas; 10 horas e 12 horas, em temperaturas de 15°C; 25°C;

35°C; 45°C e 50°C e em agitação orbital de 50 rpm; 100 rpm; 150 rpm; 200 rpm e 250 rpm. Após as reações de esterificação concluídas, as amostras foram analisadas em triplicatas em frascos de Erlenmeyer com 0,5g da amostra (butirato de etila/ butirato de metila), com 25mL de álcool comercial neutralizado e duas gotas de fenolftaleína como indicador. Cada amostra foi titulada com a solução de KOH 0,1 mmol.L⁻¹ até a modificação da cor para um rosa suave. Finalizando as titulações, os volumes totais consumidos foram utilizados na equação 3 para a obtenção do índice de acidez (IA), analisado pelo método 5-40 AOCS (MAGDI M. MOSSOBA; JOHN KRAMER, 2010). A melhor condição reacional foi usada para a realização dos ciclos (reuso do biocatalisador).

Eq. (3):

$$AI = \frac{V_{KOH} \times f \times C_{KOH} \times M_{KOH}}{m}$$

Na equação 3, V_{KOH} é o volume total consumido de KOH durante a titulação, f é o fator de correção determinado pela padronização de KOH, C_{KOH} concentração de molaridade da solução de KOH, M_{KOH} é a massa molar de KOH e m é a massa da amostra pesada nos erlenmeyers que foram analisadas em titulação. A conversão do ácido butírico nos ésteres de butirato de etila e butirato de metila é apresentada na equação (CAVALCANTI *et al.*, 2018), onde I_{ai} corresponde ao índice de acidez inicial, no qual é a concentração inicial de ácido na amostra, I_{af} representa o valor de acidez final, ou seja, o ácido butírico restante da solução o qual não foi utilizado pela enzima.

Eq. (4):

$$C(\%) = \frac{(I_{ai} - I_{af})}{I_{ai}} \times 100$$

3.2.8 Estabilidade operacional do derivado

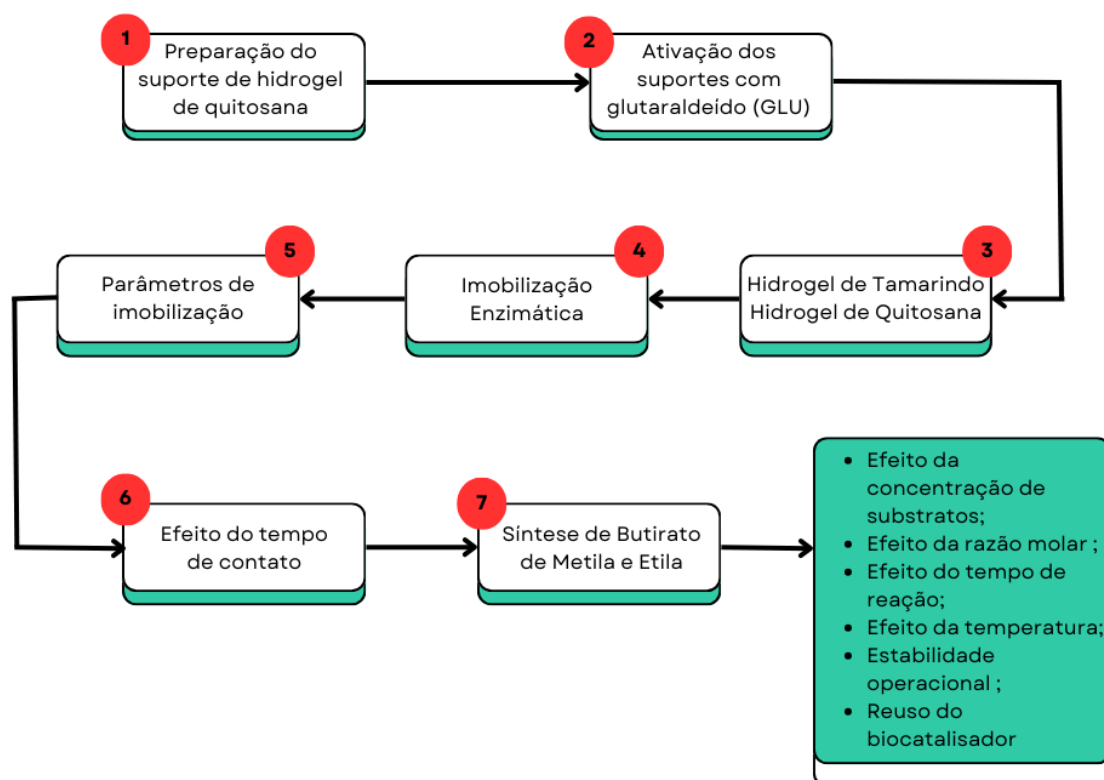
Para a síntese dos ésteres butirato de etila e butirato de metila foram necessários estudos que apresentassem o melhor desempenho destes ésteres, a partir dos valores das atividades catalíticas. A estabilidade operacional ocorreu baseada nas reações consecutivas da síntese dos ésteres (butirato de etila e butirato de metila). Para a produção

de butirato de etila foram colocados em micro tubos de plástico 0,01g de hidrogel de tamarindo + 80 UpNPB.g⁻¹ de carga enzimática - ET2 (imobilizada em 24 horas), em 1mL do meio reacional contendo: hexano, etanol e ácido butírico. Para a produção de butirato de metila foram colocados em micro tubos de plástico 0,01g de hidrogel de tamarindo + 80 UpNPB.g⁻¹ de carga enzimática - ET2 (imobilizada em 24 horas), em 1mL do meio reacional contendo: hexano, metanol e de ácido butírico. Antes de cada novo ciclo o biocatalisador (hidrogel de tamarindo + ET2) foi lavado com hexano para a remoção de substratos que não reagiram. A mistura reacional foi submetida a agitação orbital de 150rpm, a 25°C por doze ciclos consecutivos.

3.2.9 Reuso do biocatalisador

Após os procedimentos de esterificação realizados, os biocatalisadores recuperados contendo enzima de ET2 (TH/ET2) foram separados dos ésteres butirato de metila e etila, lavados com excesso de hexano, esperado evaporar o hexano completamente e armazenado em refrigerador, com temperatura de 5°C, com o objetivo de identificar a existência ou não de atividade enzimática, mesmo após a sua utilização em processos anteriores. Ao completar 120 dias foi realizado a primeira leitura de atividade enzimática no espectrofotômetro, em 150 dias foi realizado a segunda leitura do biocatalisador recuperado, em 180 dias a terceira leitura foi realizada, assim ocorreram as leituras de atividade de derivado a cada 30 dias, totalizando 180 dias de armazenamento do biocatalisador recuperado. A figura 8 demonstra as sete principais etapas realizadas para a construção do presente estudo.

Figura 8. Principais etapas realizadas durante o desenvolvimento do trabalho.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

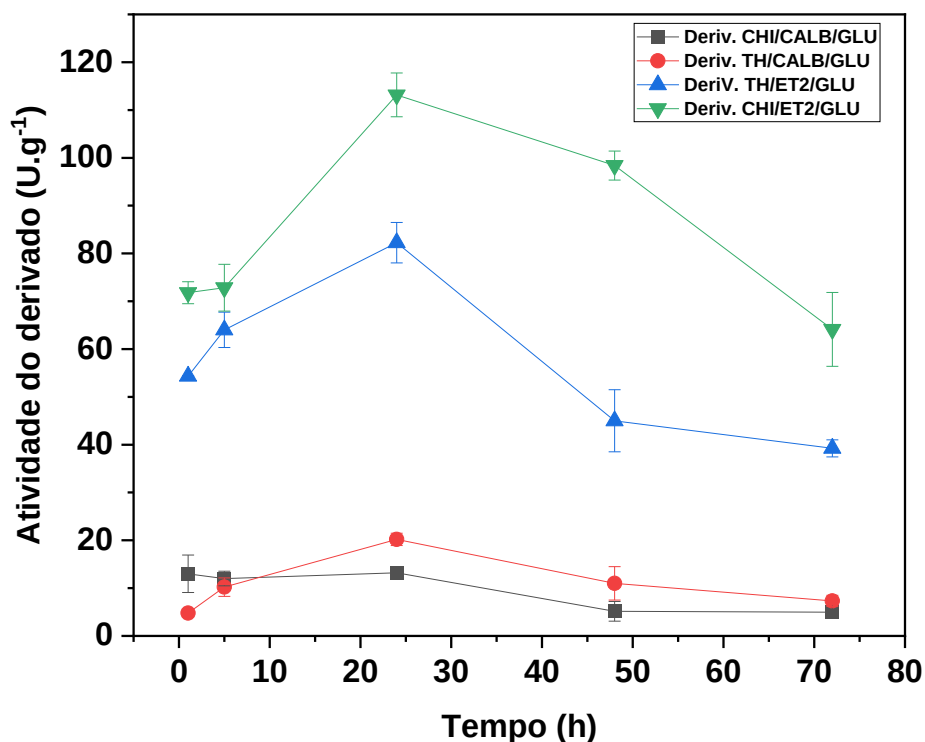
4.1 Efeito do tempo de contato na imobilização enzimática

O estudo inicial, para avaliar o tempo de contato enzima-suporte, foi realizado com testes prévios utilizando o hidrogel de quitosana e o hidrogel de tamarindo com as enzimas CALB e ET2, com o objetivo de analisar a ligação mais eficiente para o derivado. As análises ocorreram em períodos distintos, sendo eles de: 1h, 5h, 24h, 48h e 72 horas, com carga enzimática de 80 UpNPB.g^{-1} . Todas as soluções enzimáticas foram preparadas nas mesmas condições, sendo todos os suportes ativados com glutaraldeído. As combinações que obtiveram melhores resultados utilizando o suporte de quitosana foram: hidrogel de quitosana com a enzima ET2 foram bastante satisfatórios, como apresentados na figura 3. Na literatura é possível obter resultados importantes que comprovam que a combinação da quitosana com CALB é compatível e obtêm-se excelentes resultados de atividade enzimática, especialmente no período de imobilização enzimática de até 24

horas em agitação orbital, com a enzima ET2 não seria diferente, já que o hidrogel de quitosana se comporta como excelente suporte para imobilização enzimática, como demonstra o autor Pinheiro et al. (2019) em seu trabalho, assim como a pesquisa de Silva et al. (2012) e as análises do autor Adriano et al. (2005).

No presente estudo, o suporte de quitosana/enzima CALB/glutaraldeído obteve um rendimento de imobilização em 1 hora e em 24 horas de 91% e 92%, e a máxima atividade do derivado de 13 Ug^{-1} e $13,2 \text{ Ug}^{-1}$, respectivamente, de acordo com a tabela 1. Em contrapartida, o suporte de quitosana/enzima ET2/glutaraldeído obteve máxima atingida de atividade do derivado de $113,16 \text{ Ug}^{-1}$ em 24 horas, demonstrando que a enzima Eversa® Transform 2.0 mostrou compatibilidade com o suporte (Figura 01). O suporte de hidrogel de quitosana é compatível com a CALB por diversos meios de imobilização enzimática, como diversos estudos relatam (URRUTIA *et al.*, 2018) (DA S. MOREIRA *et al.*, 2022) (DE SOUZA, TICIANE C. et al., 2020), entretanto, ainda existem poucos estudos que abordam a enzima Eversa® Transform 2.0 e a quitosana (ALMEIDA, FRANCISCO LUCAS CHAVES et al., 2023) (FRAGA, FERNANDA CRISTINA et al., 2019). Os resultados dos suportes imobilizados, as atividades dos derivados, bem como os efeitos de tempo de contato estão expostos na figura 9 e tabela 1.

Figura 9. Efeito da carga enzimática (A_t , U.g^{-1}) na imobilização de CALB em CHI; CALB em TH e ET2 em CHI; ET2 em TH. Atividade do derivado (U.g^{-1}) de CALB/CHI (■); CALB/TH (●); ET2/CHI (▼) e ET2/TH (▲). As linhas representam as tendências dos dados experimentais.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 1: Melhores condições de imobilização dos suportes: Hidrogel Quitosana + CALB, Hidrogel Quitosana + EVERSA, Hidrogel de Tamarindo + CALB e Hidrogel de Tamarindo + EVERSA

Derivado	24h de Imobilização
Hidrogel Quitosana + CALB	13,2 U.g ⁻¹
Hidrogel Quitosana + ET2	113 U.g ⁻¹
Hidrogel de Tamarindo + CALB	20,18 U.g ⁻¹
Hidrogel de Tamarindo + ET2	82,26 U.g ⁻¹

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os suportes de hidrogel de tamarindo/enzima CALB/glutaraldeído obtiveram uma atividade do derivado de 20,18 Ug⁻¹ em 24 horas, demonstrando atividade superior quando comparado ao suporte de quitosana/CALB, entretanto, o hidrogel de tamarindo/enzima ET2/ glutaraldeído resultou em atividade ainda maior de derivado, de 82,26 Ug⁻¹, também em máxima atingida de 24 horas, evidenciando que o suporte de

hidrogel de tamarindo se mostrou mais compatível com a enzima ET2 do que com a enzima CALB, além de demonstrar que a quitosana é um ótimo suporte para o ET2, pois obteve-se resultados bastante satisfatórios para CHI/ET2/GLU. É possível observar um decaimento após o máximo de atividade de derivado ser atingido em 24 horas em todos os pontos estudados (CHI/CALB/GLU; CHI/ET2/GLU; TH/CALB/GLU e TH/ET2/GLU), isto deve-se pelo tempo de incubação longo aos quais foram submetidos, o que está diretamente ligado as interações enzima-suporte.

A quitosana possui inúmeras aplicações, em campos farmacêuticos, industriais, de biomedicina, biotecnologia e dentre outros. Já é comprovado que suportes a base de quitosana (biocatalisadores) são excelentes em reações de imobilização enzimática, como no estudo que explorou a mistura da lipase A *Candida antarctica* (CALA) e CALB com o suporte de quitosana ativado com glutaraldeído obteve 46,01 U g^{-1} de atividade do derivado em 1 hora (DA S. MOREIRA *et al.*, 2022).

Outro estudo que utilizou a enzima CALB e o suporte de quitosana foi o de Pinheiro et al. (2019), neste o suporte possui como agente ativador a divinilsulfona (DVS) e apresentou atividade de 14.520, 37 U g^{-1} . Em um estudo mais recente, realizou análises de imobilização com quitosana, glutaraldeído imobilizando covalentemente em β -D-galactosidase (β G), em esferas gelificante (WAHBA, 2023) que resultou em uma eficiência de imobilização de 47,67%, já seu reuso após 77 dias resultou em 97,30% de atividade, constatando ótimo desempenho e estabilidade operacional. Já na imobilização da CALA em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e ativadas com glutaraldeído (CALB-MNP), obtiveram resultados de atividade de derivado de 208,0 U g^{-1} e 84,1% de rendimento de imobilização (MONTEIRO; LIMA; *et al.*, 2019; MONTEIRO; NETO; *et al.*, 2019).

O suporte de hidrogel de quitosana foi analisado para a descoloração de corantes sintéticos industriais na imobilização da enzima lacase da cepa *Alcaligenes faecalis* XFI de duas formas, uma foi utilizando o suporte em contas (CB) e o outro utilizando o suporte em esferas compostas de quitosana-argila (CCB), os resultados de imobilização foram: 140 U g^{-1} para CB e 151 U g^{-1} de atividade de derivado (MEHANDIA; SHARMA; ARYA, 2020). Um dos estudos o qual se baseou a preparação do hidrogel de quitosana do presente trabalho foi de SILVA et al. (2012), o qual é realizado a imobilização enzimática da CALB em hidrogéis de quitosana e quitosana-alginato, utilizando o glutaraldeído como agente ativador, os quais obtiveram resultados de atividade de derivado 5,95 U g^{-1} e 4,46 U g^{-1} , respectivamente. Com base nas análises realizadas, é possível concluir que os resultados

obtidos foram bastante satisfatórios, uma vez que a atividade de derivado da lipase comercial imobilizada da Novozym 435 ($529,72 \pm 11,7 \text{ Ug}^{-1}$), apresentado no trabalho de SILVA et al. (2012), e as atividades de derivados apresentadas no presente trabalho, utilizando tanto a CALB como a ET2 imobilizadas em hidrogel de tamarindo, obtiveram resultados excelentes, para TH/CALB $20,18 \text{ U.g}^{-1}$ e para TH/ET2 $82,26 \text{ U.g}^{-1}$ em 24 horas de imobilização, identificando que o biocatalisador utilizado influencia significativamente na eficácia do processo de imobilização enzimática.

Nos estudos anteriormente citados é possível constatar que os resultados de imobilização obtidos com a CALB/CHI/GLU foram satisfatórios e dentro do esperado para as análises, uma vez que o suporte utilizado neste trabalho foram hidrogéis e é possível que a diferença dos valores mencionados seja devido a biocompatibilidade entre o suporte e as enzimas, a carga enzimática, ao pH utilizado para imobilização ou temperatura, uma vez que as melhores condições são analisadas para cada tipo diferente de suporte e enzima, mas é passível de comparação por usarem componentes semelhantes, como é o caso das enzimas, a quitosana e o glutaraldeído em alguns trabalhos.

No estudo de Sousa (2022) a enzima Eversa® Transform 2.0 (ET2) foi imobilizada em um suporte híbrido (biocatalisador) de quitosana e agarose (CHI/AGA), utilizando também glutaraldeído como agente ativador, foi concluído que o suporte e a enzima obtiveram atividade de derivado de $74,39 \text{ Ug}^{-1}$ em temperatura de 25°C em 1 hora. Em um outro estudo recente de Santos (2023) também imobilizando ET2, mas em um suporte de nanopartículas magnéticas modificado com APTES e glutaraldeído, o resultado de atividade do derivado foi de $195,36 \text{ Ug}^{-1}$ também em 1 hora. Quando comparado a enzima ET2 imobilizada em CHI no estudo, é perceptível a diferença de atividades, pois no trabalho foi constatado a atividade do derivado de $113,16 \text{ Ug}^{-1}$ em 24 horas em 25°C , sendo um resultado superior ao encontrado em estudos recentes. Não foi possível encontrar artigos científicos que se assemelhem ao trabalho até o presente momento, apenas comparado ao hidrogel de quitosana que, devido a isso, a comparação da ET2 em suporte de hidrogel de tamarindo ativado em glutaraldeído, que resultou em atividade de derivado de $82,26 \text{ Ug}^{-1}$, considera-se como uma resposta satisfatória quando comparado a estudos semelhantes que fazem uso das enzimas estudadas (CALB e ET2).

Os suportes de hidrogéis utilizados em imobilização enzimática fazem uso das ligações covalentes, as quais evitam o risco de lixiviação enzimática e mantem a estabilidade da enzima, estabelecendo ligações covalentes entre a superfície da enzima e matriz principal do hidrogel, em que podem ser grupos funcionais como aldeído, grupos

amino, agarose, dextrano, carboxila e dentre outros (MEYER, JOHANNA; MEYER; KARA, 2022). A imobilização covalente mais conhecida em pesquisas científicas trata-se da reticulação do glutaraldeído, pois este agente ativador é solúvel em solventes aquosos, além de formar interligações e intraligações subcovalentes, o suporte de hidrogel ativado com glutaraldeído auxilia na formação de interações covalentes, uma vez que o grupo aldeído do GLU liga-se com o grupo amina da quitosana, bem como o grupo amina do hidrogel de tamarindo e com o grupo amina da enzima (ALARCON-ANGELES; ÁLVAREZ-ROMERO; MERKOÇI, 2018).

O efeito do tempo de contato depende diretamente do suporte e da enzima utilizada, é retratado que a CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas geralmente apresenta tempo de contato curto, como 1 ou 2 horas (MARIA CRISTIANE MARTINS DE SOUZA, 2013). No presente trabalho, a quitosana foi ativada com glutaraldeído em 2 horas a 25°C e a atividade de derivada só atingiu o máximo em 24 horas em todos os pontos. Baseado nos resultados atingidos, a elevada atividade de TH/ET2/GLU serviu como resultado inicial a ser realizado nos estudos seguintes, utilizando o tempo de contato de 24 horas.

4.2 Efeito da concentração de substratos

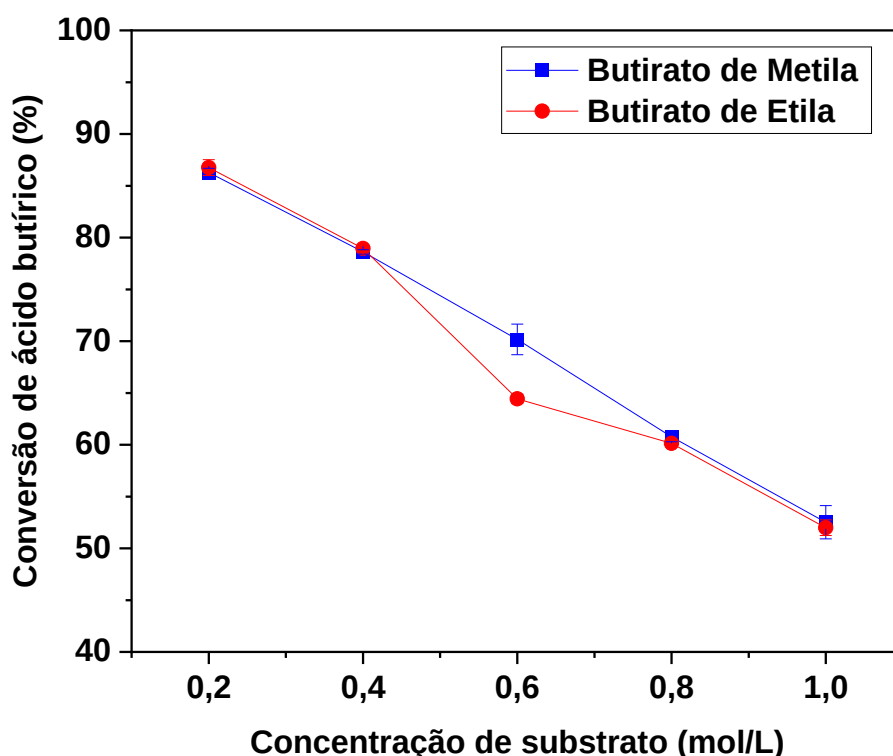
Os biocatalisadores produzidos com o uso das enzimas lipases possuem a função de acelerar reações químicas, bem como otimizar o meio reacional (ISAMAYRA GERMANO DE SOUSA, 2022). As enzimas lipases imobilizadas favorecem na diminuição de fatores desfavoráveis, os quais prejudicam as condições do procedimento, tais fatores são: inibição do procedimento devido as elevadas concentrações das substâncias envolvidas e o declínio da estabilidade, permitindo que o meio reacional permaneça insolúvel e estável (SUGAHARA; VARÉA, 2014) (ZHANG, Dong-Hao; YUWEN; PENG, 2013). Outros fatores também influenciam diretamente nas características físico-químicas para a produção dos ésteres butirato de metila e etila, além de afetar também nas reações de síntese de conversão, por isso são necessárias pesquisas e análises destes fatores: razão molar, temperatura de reação, concentração de substratos, velocidade de agitação e dentre outros.

A figura 10 apresenta o perfil para a conversão dos ésteres butirato de metila e etila, em que as maiores conversões obtidas de ambos foram nas primeiras análises, 86,38% de conversão em butirato de metila e 86,76% de conversão para butirato de etila, nas

condições de 0,2 mol/L de substratos, em razão molar 1:1 e em 8 horas de reação (SOUZA, M. C. M., 2013; SOUZA, M. C. M. de et al., 2017). Com o aumento das concentrações molares, houveram o declínio nas conversões, para butirato de metila em 1,0 mol/L a conversão foi de 52,52%, já para butirato de etila em 1,0 mol/L foi de 51,99%.

As menores concentrações de álcoois e de ácido butírico, bem como as maiores concentrações de hexano no meio reacional, inicialmente, proporcionaram o aumento para a conversão de ácido butírico para ambos os ésteres, butirato de metila e etila. Ocorrendo o aumento dos álcoois e do ácido butírico, consequentemente ocasionando a diminuição do hexano, houveram quedas na síntese de conversão dos ésteres. Isto pode ser explicado devido o hexano ser um alcano bastante volátil, quanto menor sua concentração, menor também foram as conversões. O hexano não faz ligações com metanol, devido ao metanol ser uma molécula polar e o hexano apolar, sendo então imiscíveis em estado líquido, já o etanol é miscível em hexano, isso porque o etanol é composto por partes apolares e polares, sendo pouco, mas solúvel em hexano (ADLERCREUTZ, 2013) (GHORI; IQBAL; HAMEED, 2011) (TJØRNELUND *et al.*, 2023). Os álcoois também são relatados como inibidores das enzimas, podendo haver a desnaturação da enzima, o que reduz a atividade enzimática (XU, Yan *et al.*, 2002).

Figura 10. Efeito da concentração de substratos na conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 U_{*p*}NPB.g⁻¹), a 25°C, 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L; 0,4 mol/L; 0,6 mol/L; 0,8 mol/L e 1,0 mol/L, em 8 horas de reação. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Já a enzima e o hexano aumentam a rigidez e possuem boa estabilidade, o número de ligações de hidrogênio das enzimas aumentam na presença de hexano, mas quando o hexano não encontra-se presente, ocorrendo a evaporação, as ligações de hidrogênio formadas podem desnaturar parcialmente as estruturas das enzimas (VAHIDI *et al.*, 2023). A maior parte das mudanças eletrostáticas que ocorrem nas lipases são distantes do sítio ativo, o que favorece na preservação funcional quando estas se encontram em hexano, pois entre eles existem apenas interações hidrofóbicas, não alterando significativamente a estrutura ou o sítio ativo da enzima (WANG, SHIHUI *et al.*, 2016).

Os resultados obtidos também podem ser explicados pela ligação entre o substrato e a enzima, os quais devem se ligar corretamente para que sejam eficazes. Com o aumento da concentração de substratos, acarreta o aumento de tentativas de ligação entre as moléculas do substrato com a enzima, tornando o complexo substrato-enzima ineficaz e desacelerando a reação (YADAV; DEVI, 2004). Ou seja, com o aumento das concentrações de substratos consequentemente ocasionam na diminuição das conversões, que em muitos estudos apontam este efeito devido ao acúmulo de água durante a reação,

que podem promover reação de hidrólise reversa (RODRIGUEZ-NOGALES; ROURA; CONTRERAS, 2005) (CHOWDARY; RAMESH; PRAPULLA, 2000) (DAVE; MADAMWAR, 2006), além da imobilização enzimática ser eficaz contra a inibição dos álcoois em concentrações elevadas, pois o álcool consegue atuar como inibidor terminal na síntese de ésteres que possuem o comprimento de cadeia longa (CHEN, JYH-PING, 1996).

No presente estudo pode-se concluir que o efeito de inibição aconteceu com o aumento das concentrações de substratos, o que é verificado pela elevada solubilidade dos álcoois presentes no meio reacional. Outros estudos também comprovam os resultados obtidos, como o de (DIAS, SUZANA F. *et al.*, 1991) (CHEN, JYH-PING, 1996) e (SOUZA, M. C. M. de *et al.*, 2017), os quais obtiveram resultados similares, mesmo não fazendo uso da mesma enzima analisada no presente trabalho. Os estudos enfatizam que a imobilização da enzima lipase *Candida rugosa*, utilizando hexano como solvente, sendo imobilizada em suporte de poliuretano, obteve conversão satisfatória de butirato de etila em concentração de 0,3 mol/L, com conversão de 76% (DIAS, Suzana F. *et al.*, 1991).

No estudo de Chen (1996), é demonstrado a imobilização da enzima lipase *Candida cylindracea*, em suporte de aprisionamento em géis hidrofóbicos, utilizando também o hexano como solvente, para a produção de butirato de etila, sendo atingida na concentração de 0,4 mol/L, com aproximadamente 100% de conversão, na qual ocorreu a diminuição após quinze ciclos, o que reteve a atividade inicial em 70% (CHEN, JYH-PING, 1996). Já no estudo o qual foi baseado o presente trabalho, a CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas, utilizando o heptano como solvente, a melhor conversão de butirato de etila foi obtida na concentração de 0,4 mol/L, com conversão de 97% (SOUZA, M. C. M. de *et al.*, 2017).

4.3 Efeito da razão molar (álcool:ácido / ácido:álcool)

Os hidrogéis possuem características variadas, uma delas é a de ajustar seu volume quando é submetido a estímulos, sendo estes físicos ou químicos, como luz, pH, temperatura, enzima, campo magnético e dentre outros, utilizando combinações de reticulantes e de copolímeros além de serem adaptáveis mecânica e quimicamente (MUNIM; RAZA, 2019) (MUNIM; RAZA, 2019) (HEMMATI; GHAEMY, 2016). A porção hidrofílica a qual os hidrogéis possuem, os auxiliam na absorção de fluidos,

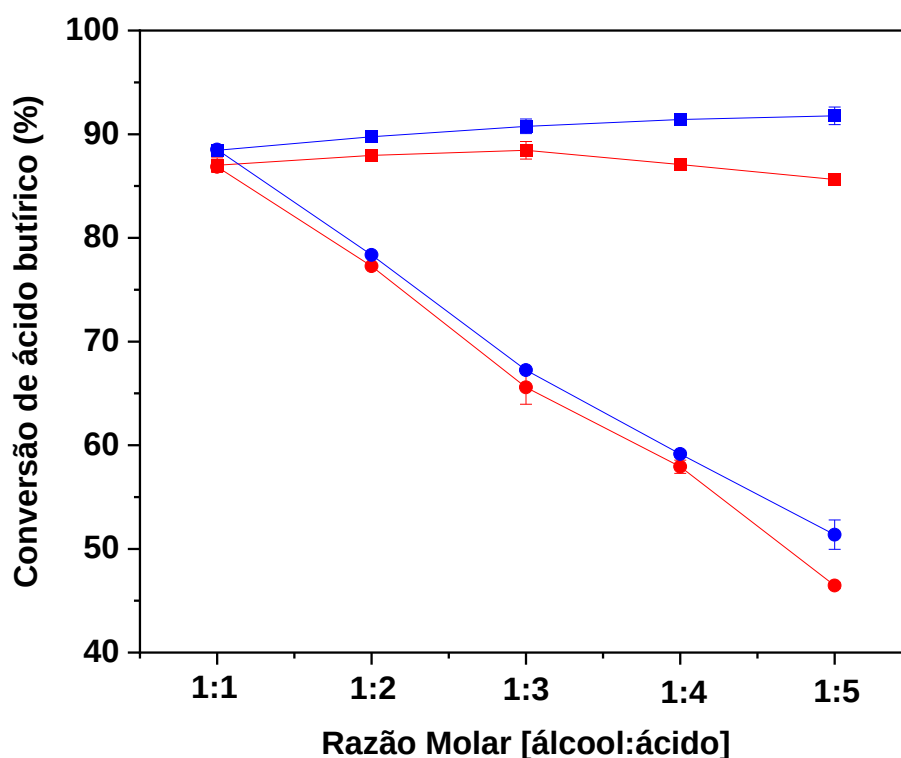
fazendo com que seu volume seja expandido, esse processo é denominado inchaço e esse inchaço varia de acordo com os grupos hidrofílicos presentes ou não nos hidrogéis, ocasionando o aumento de densidade e causando nível de equilíbrio (MURARIU; DUBOIS, 2016) (ZHAN; CHU, 2002) (MEENA; SINGH; WARKAR, 2023).

Os solventes orgânicos são conhecidos como agentes desnaturantes, isto acontece devido a forte tendência em destruir a estrutura de uma proteína, além de interromperem as interações com moléculas de água, tendo alta capacidade de solubilização, causando a modificação de toda a estrutura tridimensional da proteína (WU, XIAOLING; YANG; GE, 2017). Com o objetivo de evitar esta desnaturação proteica ou inativação da enzima, a imobilização de enzimas em suportes sólidos é bem aceita (BAYRAMOGLU *et al.*, 2022). Devido ao efeito pequeno na desnaturação de proteínas e sua taxa de hidrofobicidade, o solvente orgânico hexano foi utilizado para a produção de butirato de metila e etila (KERAMATI; FERDOWSI; ZAMIR, 2021) (GRAVEL *et al.*, 2021), além de ser comprovado que a hidrofobicidade dos solventes orgânicos afeta as atividades enzimáticas (JIN *et al.*, 2012).

Realizado os estudos de imobilização, o melhor tempo obtido para TH/ET2/GLU sendo em 24 horas, foram iniciados os processos de investigação das reações de esterificação para a produção dos ésteres butirato de etila e butirato de metila. Inicialmente foram mantidos os melhores resultados obtidos nos estudos de (MARIA CRISTIANE MARTINS DE SOUZA, 2013) para investigação inicial da razão molar de cada processo de esterificação, as amostras foram submetidas a 25°C, a 150 rpm, no período de 8 horas.

A princípio, a concentração de ácido butírico permaneceu constante, variando apenas as concentrações de álcool, em seguida a concentração de álcool permaneceu constante, variando desta vez apenas as concentrações de ácido. A figura 11 apresenta o perfil de influência exercida nas diferentes razões molares durante a conversão de butirato de metila e butirato de etila, o máximo de conversão obtida foi alcançado com a variação de álcool:ácido, no qual variou-se apenas o álcool e o ácido permaneceu-se constante.

Figura 11. Efeito da carga razão molar (álcool:ácido) na reação de esterificação para a produção dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. Perfil da variação de álcool (■) e de ácido (●) para butirato de metila. Perfil da variação de álcool (■) e de ácido (●) para butirato de etila. As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹), a 25°C, 150 rpm, hexano, em 8 horas de reação, 1:5 (butirato de metila), 1:3 (butirato de etila). Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a conversão de butirato de metila (■) a melhor razão molar foi de 1:5 com uma taxa de conversão de 91,77%, já para o butirato de etila (■) a melhor razão molar foi de 1:3 com uma taxa de conversão de 88,45%. O excesso de álcool não apresentou alterações significativas durante a síntese dos ésteres. No entanto, o excesso de ácido reduziu a taxa de conversão dos ésteres, para a produção de butirato de metila a conversão chegou a taxa de diminuição de 51,37% e para a conversão de butirato de etila a conversão chegou a 46,46%. Todas as primeiras conversões obtidas de 1:1 resultaram em valores satisfatórios, tanto na variação de álcool:ácido, como ácido:álcool, variando entre 86% a 88% de conversão.

O equilíbrio das reações de esterificação pode ser conseguido pela adição em excesso de ácido, álcool ou até mesmo a remoção de algum componente presente na mistura reacional (SINGH, NISHA; RAJ KUMAR; SACHAN, 2013) (ERGAN; TRANI; ANDRÉ, 1991). Para garantir o melhor rendimento das taxas de conversão é necessário que a reação tenha uma proporção molar de substratos apropriada, ou seja, caso exista o aumento expressivo tanto do etanol como do ácido butírico, ambos seriam inibidores durante a reação, ou seja, o excesso de ácido butírico ou de álcool promovem uma inibição

do substrato, o que evidencia que quando existe proporções molares maiores do que o esperado, as taxas de conversão diminuem (PIRES-CABRAL; DA FONSECA; FERREIRA-DIAS, 2009) (SHU *et al.*, 2011).

As reações de esterificação são reversíveis, devido a isso as taxas de conversão são explicadas na prática, em que quando ocorre o aumento proporcional de álcool e ácido butírico, a reação pode ser conduzida até a conclusão, ou seja, com o aumento do álcool a conversão para ácido butírico também aumenta e logo depois diminui, sendo assim é necessário que os reagentes estejam em proporções equimolares, conforme a estequiometria da reação, mas para que ocorra a máxima de conversão um dos reagentes deve estar em excesso (DANGE; SHARMA; RATHOD, 2014) (ROMERO; CALVO; ALBA; DANESHFAR; *et al.*, 2005; ROMERO; CALVO; ALBA; HABULIN; *et al.*, 2005).

Quando existe o aumento expressivo da concentração de álcool ocorre a formação de ligações das moléculas de álcool com a enzima, o que dificulta a formação de ligações do ácido, conseqüentemente ocorre a diminuição da conversão do ácido butírico, pois toda a reação estará limitada com a quantidade de ácido presente ao redor da enzima (DANGE; KULKARNI; RATHOD, 2015) (NORDBLAD; ADLERCREUTZ, 2008). Os resultados das análises de razão molar indicaram que a conversão máxima de equilíbrio atingida do ácido butírico foi eficaz quando houve o aumento de álcool, em que a maior eficiência foi atingida 1:5 para o butirato de metila e em 1:3 para butirato de etila, com ambas as concentrações molares de 0,2 mol/L.

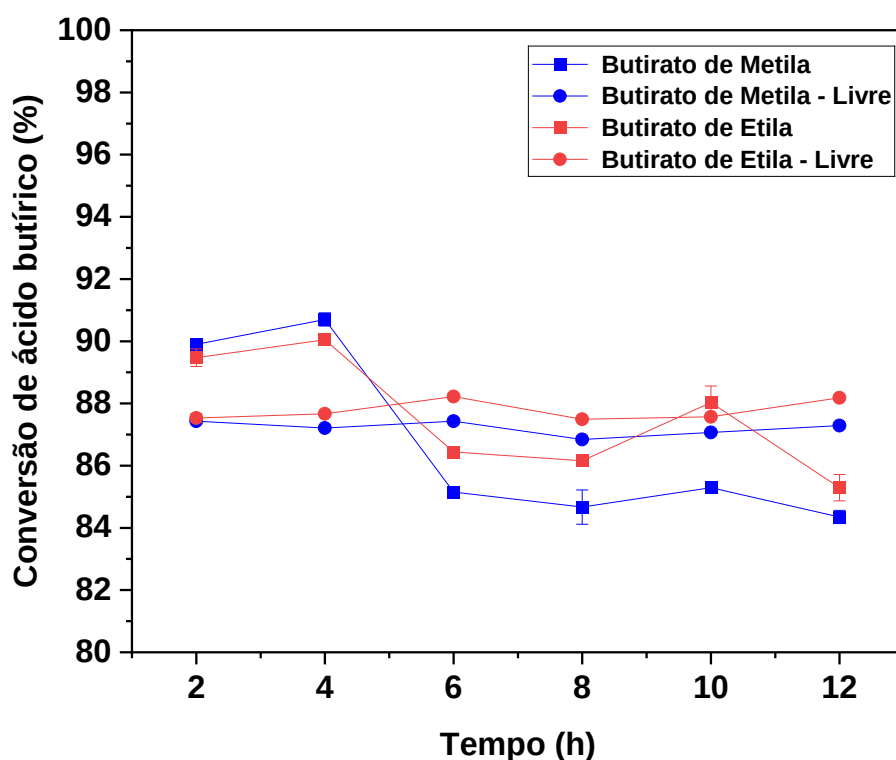
4.4 Efeito do tempo de reação

As análises realizadas para o efeito do tempo de conversão são apresentadas na figura 12, na qual é possível identificar que os ésteres obtiverem melhor resultado no período de 4 horas, com conversão de 90,70% para butirato de metila e 90,05% para butirato de etila, sendo as conversões mais elevadas da análise do tempo. No período de 1 hora houve uma aproximação nos melhores valores de conversão analisados em 4 horas, para butirato de metila em 1 hora a conversão foi de 89,90% e para butirato de etila no mesmo período foi de 89,47%. Passada as 4 horas, foi possível identificar uma queda considerável nas conversões, identificando que a partir dos valores coerentes das concentrações de substratos e razões molares, foi possível obter valores elevados em 4 horas de conversão, até o presente período do estudo.

O estudo do tempo dispõe de uma análise de desempenho da enzima ao passo em que a reação progride, obtendo assim o menor tempo necessário para a realização da conversão. Em alguns estudos é identificado o forte relato que as reações de esterificação das análises do efeito de tempo estão diretamente relacionadas a temperatura, a imobilização ou não das enzimas utilizadas para a formação de ésteres e até mesmo das metodologias aplicadas para as reações. No estudo de Kaur, Mehta e Gupta (2019) foi analisado a síntese do butirato de metila catalisada pela enzima lipase *Aspergillus fumigatus*, em que obteve-se um valor de conversão de 86%, em 16 horas a 40°C, não havendo aumento de conversão com o passar do tempo, o que evidencia que o menor tempo necessário para o melhor rendimento já foi obtido.

Semelhante ao estudo apresentado, a síntese de butirato de etila catalisadas pelas enzimas lipases CALA e CALB foram analisadas, em que estas foram imobilizadas em nanopartículas magnéticas, em condições de 45° e em 6 horas o valor de conversão de CALA foi de 99,2%, já para CALB o valor foi de 97,7%, nas mesmas condições Monteiro e Lima; et al. (2019) Monteiro et al. (2019). No trabalho de Friedrich et al. (2013), a CALB imobilizada em esferas de estireno-divinilbenzeno (MCI-CALB), foram submetidas a reações de esterificação na síntese de butirato de etila, apresentado conversão de 85%, em 37°C, em 1 horas e 30 minutos.

Figura 12. Efeito do tempo de reação na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■), butirato de etila (■), butirato de metila – livre (●) e butirato de etila – livre (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 U_{*p*-NPB}.g⁻¹), a 25°C, 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, nos períodos de 2, 4, 6, 8, 10 e 12 horas de reação. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No estudo de Rodriguez-Nogales, Roura e Contreras (2005) a porcentagem conseguida na reação de esterificação do butirato de etila foi de 72,9%, em 96 horas e em 34° C, utilizando a lipase imobilizada de *Candida antarctica*. Em outro estudo da produção de butirato de etila, com a enzima lipase imobilizada de *Candida rugosa* em suporte de tecido de algodão, o maior rendimento de conversão obtido foi de 70,6% em 97 horas em 25°C (SHU *et al.*, 2011). É possível identificar que as conversões levaram tempos maiores para atingir uma taxa de conversão elevada, mesmo em temperaturas razoáveis, isto se deve a diversos fatores, como o suporte a qual foram imobilizadas, as concentrações adequadas de enzima e substratos, os solventes utilizados e dentre outros.

Em um estudo comparativo, no qual não se utilizou de imobilização enzimática e sim de um reator isotérmico, no qual se deu pelo método de esterificação assistida por ultrassom do butirato de metila, obteve a conversão de 91,64%, em 2 horas de reação e em 69,85°C, levando menos tempo e maior temperatura para atingir uma ótima taxa de conversão (DANGE; SHARMA; RATHOD, 2014; DANGE; KULKARNI; RATHOD, 2015), o estudo demonstra que metodologias de aplicações distintas para a produção de

ésteres podem interferir em uma conversão rápida, sendo especialmente eficaz para indústrias.

A imobilização da enzima ET2 em hidrogel de tamarindo mostrou uma conversão um pouco menor em butirato de metila e butirato de etila em comparação à enzima livre. Para o butirato de metila, a enzima livre apresentou uma conversão maior ao longo do tempo, enquanto para o butirato de etila, a diferença foi menor, mas a enzima livre ainda foi ligeiramente mais eficiente. Em resumo, a enzima livre demonstrou um desempenho um pouco melhor na conversão, embora a imobilização possa trazer outras vantagens, como maior estabilidade e reutilização. A enzima imobilizada mostra maior resistência em ambientes desfavoráveis, enquanto a enzima livre apresenta melhor desempenho apenas em condições ideais. Assim, o ambiente impacta diretamente a eficiência de conversão de ésteres para ambas as enzimas.

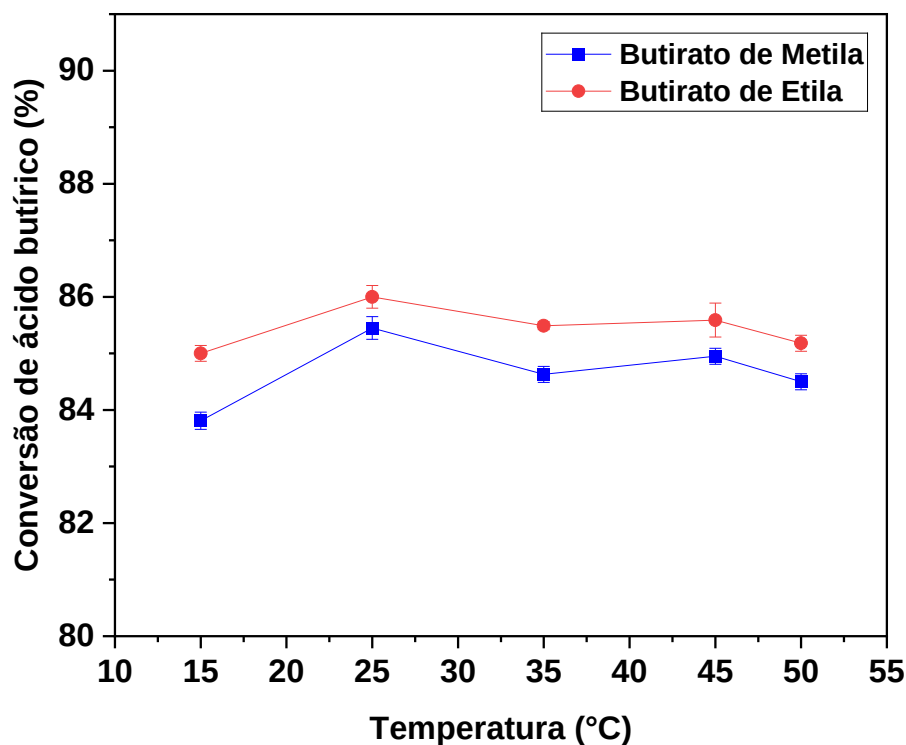
O resultado obtido no presente trabalho, nas sínteses de butirato de metila e etila com a enzima Eversa[®] Transform 2.0 imobilizada em um suporte de hidrogel de tamarindo, obteve um desempenho ótimo, quando comparado aos estudos mencionados anteriormente, estando de acordo com a literatura, apresentando em um período de tempo de apenas 4 horas e em apenas 25°C, com uma taxa de conversão elevada.

4.5 Efeito da temperatura

Durante as análises do efeito da temperatura sobre a conversão de ácido butírico por TH/ET2/GLU no período de 4 horas, é mostrado na figura 13 os valores das conversões analisadas nas temperaturas de 15°C, 25°C, 35°C, 45°C e 50°C. As conversões de butirato de metila e butirato de etila obtiveram resultados similares, apresentando seu valor máximo na temperatura de 25°C, com valores de conversão sendo 85,45% e 86%, respectivamente. Não houveram reduções drásticas das conversões, estando nas variações de 83% a 86%, não tendo aumento e diminuições expressivas, uma vez em que os menores valores de conversão foram obtidos em 15°C para os dois ésteres, para butirato de metila 83,81% e para butirato de etila 85%. Todas as análises realizadas até então já estavam sendo investigadas na temperatura de 25°C, devido ao estudo principal a qual o presente trabalho foi baseado, em que o resultado de conversão para ambos os ésteres foi de 25°C com a enzima CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas, utilizando heptano como solvente (SOUZA, M. C. M., 2013; SOUZA, M. C. M. de et al., 2017).

Em reações catalisadas por lipase, a temperatura é um fator determinante para conseguir a estabilidade térmica e resultados satisfatórios de conversões. Mesmo que em alguns estudos comprovem que com o aumento da temperatura existe o aumento das taxas de conversão, é também comprovado que estas reações quando envolvem enzimas provocam a diminuição da estabilidade das enzimas, além desse aumento de temperatura provocar a inativação da enzima (ROMERO et al., 2005) (FORESTI; FERREIRA, 2007). Com o aumento da temperatura também ocorre o redirecionamento dos coeficientes de difusão dos substratos para o sítio ativo da enzima, o que ocasiona o aumento da solubilidade dos substratos nos fluidos supercríticos, consequentemente acontece o crescimento da energia do sistema e a taxa de reação (VARMA; MADRAS, 2008).

Figura 13. Efeito da temperatura na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 U*p*NPB.g⁻¹), em temperaturas de 15°C; 25°C; 35°C; 45°C e 50°C, 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

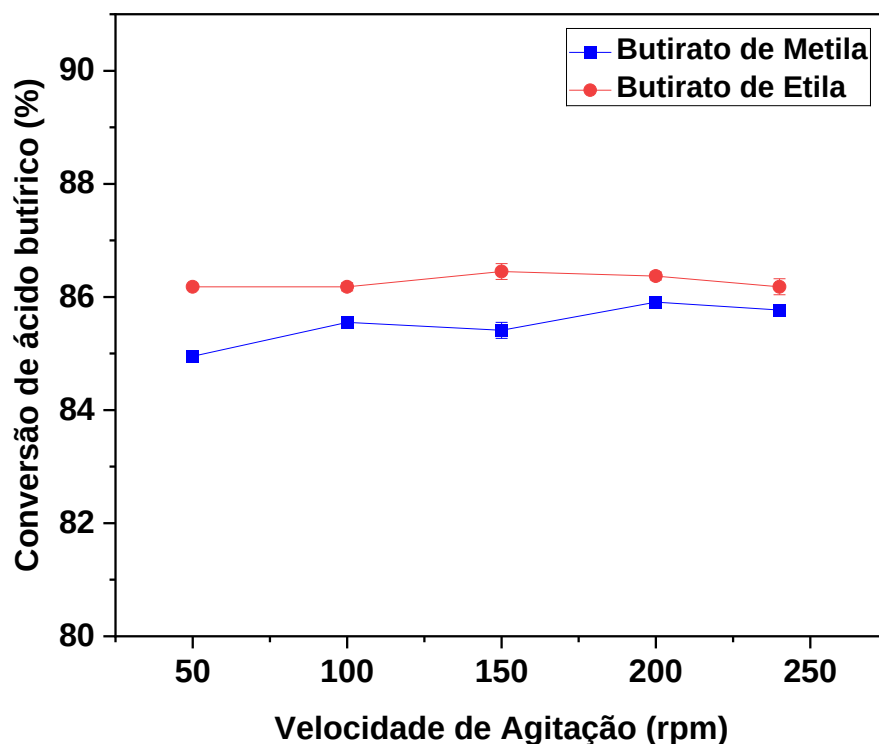
A reação de esterificação é uma reação fortemente exotérmica, o aumento da temperatura influencia no aumento da taxa de reação, ou seja, ocorre uma maior liberação de energia para o ambiente, especialmente quando os produtos utilizados forem voláteis (LI, CHENGHAO et al., 2022). Como o ponto de ebulição do metanol é de 64,6°C (PUBCHEM, 2004b) e do etanol 78,5°C (PUBCHEM, 2004a), se a temperatura se encontrar excessivamente alta, acontece a evaporação dos reagentes, especialmente o metanol, mesmo existindo o equilíbrio das ligações entre os substratos e produtos com a enzima. O que evidencia que a reação que possui metanol evapora mais rapidamente do que a que contém etanol, o que significa que as temperaturas elevadas influenciam nas colisões bem-sucedidas que ocorrem durante as conversões, bem como auxilia na redução de viscosidade, mesmo existindo a possibilidade de aumento da dissociação ácida e solubilidade, que podem afetar diretamente as reações de esterificação (DANGE; SHARMA; RATHOD, 2014) (OZYILMAZ; GEZER, 2010). Quando a temperatura encontra-se excessiva, é ocasionado a diminuição das taxas de conversão, isso ocorre devido as vibrações emitidas, que são consequências causadas pelo movimento da enzima, que interfere na formação das ligações de hidrogênio, o qual é um fator determinante para o desdobramento da enzima, que causa alteração na conformação tridimensional da mesma, ocasionando a desnaturação, a qual inativa a enzima (VARMA; MADRAS, 2008).

O autor Paludo et al. (2015) avaliou os parâmetros para a síntese de butirato de etila catalisada pela enzima *Lipozyme* TL-IM, via ultrassom, apresentou resultado ótimo em 30°C, com taxa de confiança de 95%. Já no estudo de Oliveira et al. (2019), o qual realiza as sínteses dos ésteres de butirato de metila e etila, a partir da imobilização enzimática da lipase *Rhizomucor miehei* no suporte de quitosana, utilizando heptano como solvente, em que ambos os ésteres obtiveram taxas elevadas de conversão em 25°C, no qual enfatiza que a temperatura elevada também pode provocar restrições em movimentos e a consequência da não formação de ligações covalentes entre enzima e suporte (DAVE; MADAMWAR, 2008). Os resultados citados estão em concordância com as análises realizadas, pois foram obtidos baixos valores de conversão quando já atingidos o pico máximo, com o aumento da temperatura ocorreu a diminuição, caso fosse dada continuidade, a partir dos estudos considerados, haveria uma queda significativa nas taxas de conversão.

4.6 Efeito da velocidade de agitação

A velocidade de agitação foi analisada em agitação orbital de 50 rpm; 100 rpm; 150 rpm; 200 rpm e 250 rpm, sobre a conversão de ácido butírico por TH/ET2/GLU no período de 4 horas, em temperatura de 25°C, de acordo com estudos já estabelecidos. A figura 14 identifica a influência da agitação na síntese de butirato de metila e etila, é identificado que para o butirato de metila a taxa de conversão foi de 85,91% em 200 rpm, já para o butirato de etila a taxa de conversão foi de 86,45% em 150 rpm. As demais velocidades não houve conversões maiores, permanecendo constantes entre as taxas de conversão, variando entre 84% a 86% para ambos os ésteres. Devido a não alteração considerável entre as velocidades de agitação, discutiu-se ser apropriado permanecer em 150 rpm, visto que a mesma agitação orbital já foi considerada adequada para produção dos mesmos ésteres utilizando CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas (SOUZA, M. C. M., 2013; SOUZA, M. C. M. de et al., 2017) e para a produção do éster oleato de etila, imobilizada em ET2 em nanopartículas magnéticas (SANTOS, 2023).

Figura 14. Efeito da velocidade de agitação na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 U*p*NPB.g⁻¹), em temperaturas de 25°C, em agitação orbital de 50 rpm; 100 rpm; 150 rpm; 200 rpm e 250 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Algumas inferências externas de transferências de massa podem vir a surgir ao serem analisadas reações que envolvem sistemas enzimáticos imobilizados (YADAV; DEVI, 2004). É perceptível que, ao aumentar a velocidade de agitação a taxa de conversão também aumenta até atingir o seu máximo, que após atingir a taxa ocorre a redução da conversão (FORESTI; ERRAZU; FERREIRA, 2005). A influência da velocidade de agitação na transferência de massa pode ser explicada por ter ocorrido uma diminuição de resistência à transferência de massa com o aumento da agitação orbital, por isso ocorre o aumento da conversão até atingir o seu ponto máximo (DANGE; KULKARNI; RATHOD, 2015).

Ao serem submetidas a velocidade de agitação orbital superiores, as partículas de biocatalisador são espalhadas na fase líquida, fazendo com que se prendam a parede do micro tubo, onde está ocorrendo a reação, o que torna-se limitada a carga efetiva do biocatalisador (GARLAPATI; BANERJEE, 2013). Como não houveram diferenças significativas nas taxas de conversões, é possível afirmar que a transferência de resistência externa foi irrelevante nas velocidades de agitação de 200 rpm e 250 rpm, não existindo limitação externa de transferência de massa (DE OLIVEIRA *et al.*, 2019).

Portanto, a velocidade de agitação de 150 rpm foi selecionada como ótima para os próximos estudos de esterificação.

4.7 Estabilidade operacional

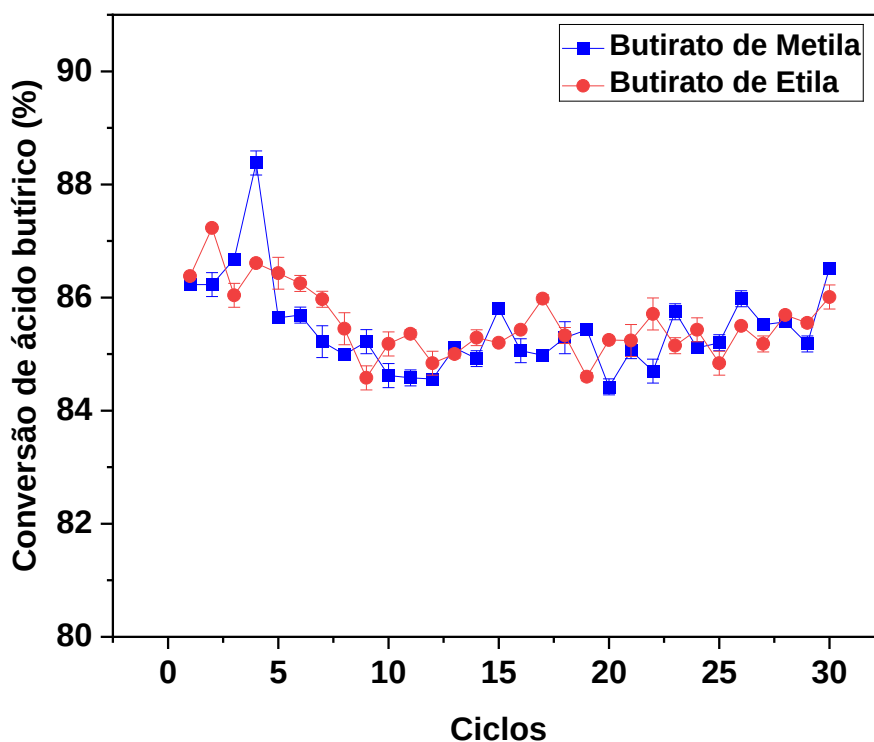
Todas as análises realizadas até o momento proporcionaram as condições a serem aplicadas na estabilidade operacional, afim de identificar os valores de conversões dos ésteres butirato de metila e etila, além da estabilidade da enzima imobilizada em hidrogel de tamarindo, mesmo após 30 ciclos de reação de reutilização consecutivas do mesmo material. A análise da estabilidade operacional se deu com a reutilização do biocatalisador, utilizando 0,01g de TH/ET2/GLU, em 4 horas de reação, a 25°C, em 150 rpm, em concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, utilizando hexano como solvente, o volume reacional foi de 1mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano).

A figura 15 apresenta os resultados de conversão obtidos na síntese de butirato de metila e butirato de etila, a conversão máxima atingida na produção de butirato de metila foi de 88,38% no 4º ciclo, já para a produção de butirato de etila a maior conversão foi de 87,23% logo no 2º ciclo, sendo as melhores condições analisadas para ambos os ésteres. A maior queda observada nos valores de conversão foram de: 84,56% no 12º ciclo e com o valor semelhante no 20º a conversão foi de 84,42%, sendo os menores valores observado para butirato de metila, no 9º ciclo foi observado o valor de conversão de 84,58% para butirato de metila, sendo o menor valor observado. Entretanto, não houve alterações significativas nos demais ciclos, variando entre 84,4% a 86%, não havendo quedas bruscas e aumentos repentinos, mantendo-se estáveis ao longo das 30 reutilizações de um mesmo biocatalisador.

O principal fator a ser empregado na enzima é a sua possível imobilização, isso porque é a partir dos diferentes métodos e materiais de imobilização que é possível realizar a recuperação das enzimas, com o objetivo de manter a estabilidade operacional da enzima (MARTINS *et al.*, 2014). Essa reutilização consecutiva só é possível quando ocorre a imobilização dessas enzimas, a qual permite que fiquem ativas por longos períodos de tempo, mesmo as enzimas sendo sensíveis a alterações ambientais (ZAAK *et al.*, 2017), o que pode favorecer as aplicações industriais, sendo economicamente viáveis e ecologicamente corretas. As lavagens do biocatalisador utilizando hexano auxilia para a remoção do excesso de substrato ou produtos presentes no interior dos biocatalisadores,

quando essa remoção não é efetiva, ou a lavagem é realizada apenas com água destilada, a inativação rápida da enzima se torna mais suscetível a ocorrer (MARTINS *et al.*, 2011). No estudo, o hexano foi utilizado durante todo o período de análise operacional, tanto na reação como solvente, junto com ácido butírico, etanol, metanol e TH/ET2, como nas lavagens a cada novo reciclo.

Figura 15. Estabilidade operacional na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas por uso de TH/ET2/GLU, atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 U*p*NPB.g⁻¹), em temperaturas de 25°C, em 150 rpm, hexano, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 4 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano). Massa de biocatalisador TH/ET2 de 0,01g.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O estudo de Monteiro *et al.* (2019) é apresentado os resultados da síntese de butirato de etila utilizando as enzimas CALA e CALB, imobilizadas em nano partículas magnéticas (MNP), a análise da estabilidade operacional deu-se em 6 horas, em 45°C, em 150 rpm e em 10 ciclos consecutivos, obtendo resultado de taxa de conversão de 99,2% para CALA-MNP e 97,5% para CALB-MNP, mantendo-se estáveis após as maiores taxas

serem atingidas, sem perdas expressivas. No trabalho de Shu et al. (2011) foi avaliado a produção de butirato de etila a partir da enzima *Candida rugosa* imobilizada em tecido de algodão, utilizando ciclohexano, em que a estabilidade operacional foi avaliada em 12 ciclos consecutivos, sendo mantido a taxa de conversão nos 12 ciclos entre 83-92%, sem perdas relevantes na eficiência de conversão.

No trabalho de Remonatto et al. (2018) foi utilizado ET2 imobilizada em Sepabeads – C18 para a produção de oleato de etila, utilizando óleo de girassol e hexano como solvente, em 3 horas de reação a 40°C, em que foram realizados quatro ciclos, em que os três primeiros apresentaram atividade residual entre 100% a 90%, sendo mantido 75% da atividade residual ao final dos ciclos, apresentando queda apenas no 4º ciclo de reação. Já em seu estudo mais recente Remonatto et al. (2022) é realizado a imobilização das enzimas ET e ET2, também no suporte hidrofóbico de Sepabeads-C18 e utilizando óleo de girassol para a produção de ésteres etílicos, os resultados para ET nos ciclos foram atingidos logo no 2º, com atividade residual máxima em 98%, permanecendo com queda leve até o 6º ciclo, já para ET2 na produção de éster etílico a atividade residual máxima também foram nos dois primeiros ciclos, entretanto, houve uma queda expressiva no 3º ciclo, apresentando 20% de atividade residual, todos as análises foram realizadas em 3 horas de reação, isento de qualquer tipo de solventes.

No estudo de Brandão Júnior et al. (2023) foi utilizado a enzima ET2 imobilizada em nanopartículas magnéticas para a produção de ésteres, a partir de óleos vegetais, obteve resultado de conversão máxima no 3º ciclo, obtendo 82,2% de conversão para o óleo de babaçu e 86% para o óleo de tucumã, ambos para a produção de ésteres etílicos, indicando diminuição leve após o terceiro ciclo, é válido ressaltar que os resultados obtidos foram nas condições de 37°C e em 8 horas de reação cada ciclo. No trabalho de Moreira (2023) foi apresentada a estabilidade operacional da síntese do oleato de etila, utilizando também ET2 imobilizada em nanopartículas magnéticas, em 16 horas de reação cada ciclo, realizando 14 ciclos no total, em que no 1º ciclo obteve o valor de conversão máxima de 88,1%, que manteve-se em 80% até o 4º ciclo, evidenciando a queda no 5º ciclo em diante.

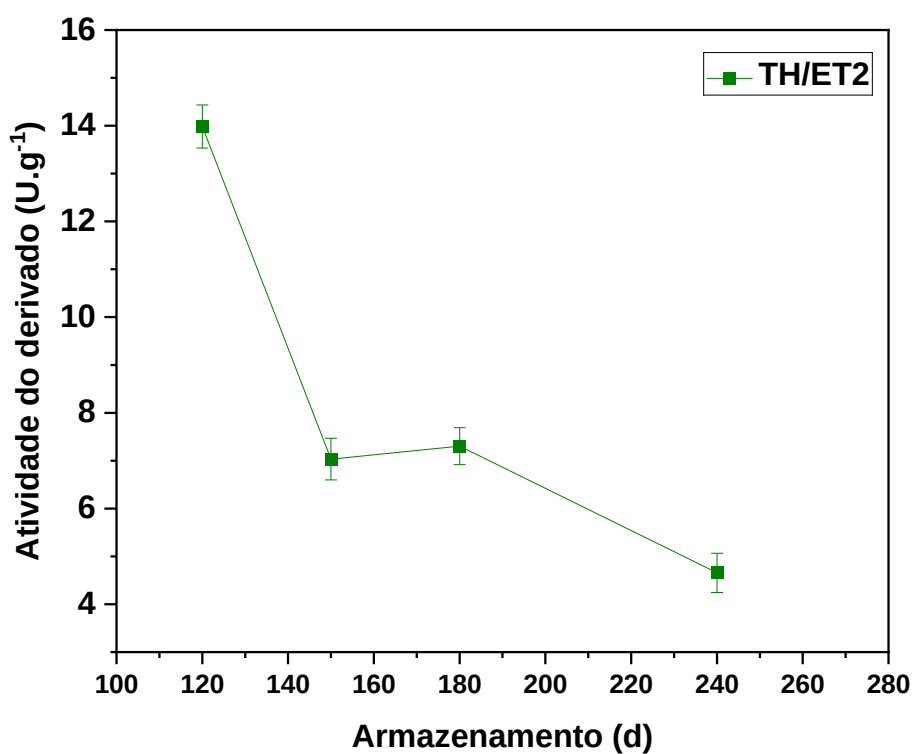
Como não ocorreram perdas significativas ao longo dos 30 ciclos analisados, é possível concluir que os resultados apresentados estão de acordo com os estudos citados anteriormente, mantendo a estabilidade de conversão após atingir a taxa de conversão máxima nos ciclos iniciais. Desta forma, todos os estudos das condições ideais a serem analisados na estabilidade operacional foram empregados com sucesso, evidenciando que

a enzima ET2 imobilizada em hidrogel de tamarindo é eficaz para a síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila.

4.8 Reuso do biocatalisador

Ao final das análises, o biocatalisador contendo a enzima ET2 (TH/ET2) foi recuperado e foram realizadas as leituras de atividade enzimática em triplicatas, com auxílio do espectrofotômetro, os resultados obtidos estão apresentados na figura 16.

Figura 16. Atividade enzimática do derivado referente a recuperação do biocatalisador de Hidrogel de tamarindo e a enzima Eversa Transform 2.0 (TH/ET2) em 180 dias de armazenamento, sob refrigeração a 5°C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após 120 dias de armazenamento a primeira leitura foi realizada, a atividade do derivado obtida resultou em 13,98 Ug⁻¹, o qual representa 16,99% do valor máximo de

atividade de derivado atingido durante as análises de atividade enzimática, o qual foi de $82,26 \text{ Ug}^{-1}$ em 24 horas de imobilização, identificando que, mesmo após as lavagens com hexano e o armazenamento sob refrigeração, o biocatalisador de hidrogel de tamarindo e a enzima ET2 ainda apresenta atividade enzimática. Após 150 dias de armazenamento a segunda leitura foi realizada e apresentou atividade de derivado de $7,03 \text{ Ug}^{-1}$, em 180 dias a terceira leitura resultou em $7,30 \text{ Ug}^{-1}$, representando 8,54% e 8,87%, respectivamente, em relação ao melhor valor de atividade de derivado alcançado. A última análise ocorreu após 240 dias de armazenamento, obtendo um resultado de $4,65 \text{ Ug}^{-1}$ de atividade de derivado, correspondendo a 5,65% do valor de atividade de TH/ET2, o que evidencia a queda no valor de atividade de derivado após períodos longos de armazenamento.

4.9 CONCLUSÕES

A esterificação do ácido butírico com metanol e etanol, na presença do biocatalisador de hidrogel de tamarindo com a enzima Eversa Transform 2.0 (TH/ET2), foi realizada com sucesso. Os resultados apresentados neste trabalho auxiliaram nas discussões e na análise final das conclusões. Foi possível concluir que o biocatalisador TH/GLU é eficiente na imobilização da enzima Eversa Transform 2.0 (ET2), em que resultou na atividade de derivado de $82,26 \text{ Ug}^{-1}$ em 24 horas utilizando TH/ET2/GLU, comprovando que o suporte de hidrogel de tamarindo (TH), ativado com glutaraldeído (GLU), proporcionou um meio adequado de imobilização para a ET2, permitindo manter a atividade catalítica por ciclos de reação consecutivos. O TH/ET2/GLU se apresentou eficaz na síntese de ésteres, evidenciando que as análises operacionais efetuadas identificaram forte influência da concentração de substratos e no efeito da razão molar (álcool:ácido), o que demonstra que o álcool e o ácido influenciam diretamente a reação.

As melhores condições obtidas neste estudo permitiram ótimas conversões dos substratos no período de 4 horas, durante a síntese de butirato de metila, com conversão de 90,70%, e durante a síntese de butirato de etila, com conversão de 90,05%. O biocatalisador de TH/ET2 se mostrou estável durante os 30 ciclos consecutivos, os quais foram submetidos a sua reutilização, com conversões de 88,38% no 4º ciclo para o butirato de metila e de 87,23% no 2º ciclo para butirato de etila. Diante dos resultados identificados, é enfatizando que o trabalho se trata de um estudo inédito, pois até o presente momento desta publicação não é possível identificar estudos que abordem o uso de um hidrogel de fruta sendo utilizado como suporte para imobilização enzimática. A

conclusão do trabalho aborda que o uso do biocatalisador de TH/ET2 é bastante eficaz para a produção dos ésteres butirato de metila e butirato de etila, sendo vantajoso para indústrias com excelente custo benefício, sendo acessível e ecologicamente correto.

5 REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, Patrick. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, no. 15, p. 6406, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>.

ADRIANO, W.S.; FILHO, E. H. C.; SILVA, J. A.; GIORDANO, R. L. C.; GONÇALVES, L. R.B. Stabilization of penicillin G acylase by immobilization on glutaraldehyde-activated chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 22, no. 4, p. 529–538, Dec. 2005. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322005000400005>.

ADRIANO, W.S.; VEREDAS, V.; SANTANA, C.C.; GONÇALVES, L.R.B. Adsorption of amoxicillin on chitosan beads: Kinetics, equilibrium and validation of finite bath models. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 27, no. 2, p. 132–137, Dec. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.010>.

AGGARWAL, V.; PUNDIR, C.S. Rational Design of Nanoparticle Platforms for “Cutting-the-Fat.”, 2016. p. 197–223. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.01.022>.

AHMED, Enas M. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. **Journal of Advanced Research**, vol. 6, no. 2, p. 105–121, Mar. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>.

ALARCON-ANGELES, G.; ÁLVAREZ-ROMERO, G.A.; MERKOÇI, A. Electrochemical Biosensors: Enzyme Kinetics and Role of Nanomaterials. **Encyclopedia of Interfacial Chemistry**. Elsevier, 2018. p. 140–155. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.13477-8>.

ALI, Sajid; KHAN, Sumera Afzal; HAMAYUN, Muhammad; LEE, In-Jung. The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. **Microorganisms**, vol. 11, no. 2, p. 510, 17 Feb. 2023. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020510>.

ALMEIDA, Francisco Lucas Chaves; SILVEIRA, Mariana Pereira; ALVIM, Izabela Dutra; DA COSTA, Talles Barcelos; DA SILVA, Thiago Lopes; VIEIRA, Melissa Gurgel

Adeodato; PRATA, Ana Silvia; FORTE, Marcus Bruno Soares. Jet cutter technique as a tool to achieve high lipase hydrolytic activity. **Food and Bioproducts Processing**, vol. 137, p. 189–199, Jan. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.12.001>.

ALNOCH, Robson Carlos; ALVES DOS SANTOS, Leandro; MARQUES DE ALMEIDA, Janaina; KRIEGER, Nadia; MATEO, Cesar. Recent Trends in Biomaterials for Immobilization of Lipases for Application in Non-Conventional Media. **Catalysts**, vol. 10, no. 6, p. 697, 20 Jun. 2020. <https://doi.org/10.3390/catal10060697>.

AMOA, Jerome; HO, Shih-Hsin; HAMA, Shinji; YOSHIDA, Ayumi; NAKANISHI, Akihito; HASUNUMA, Tomohisa; OGINO, Chiaki; KONDO, Akihiko. Lipase cocktail for efficient conversion of oils containing phospholipids to biodiesel. **Bioresource Technology**, vol. 211, p. 224–230, Jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.03.062>.

ANGAJALA, Gangadhara; PAVAN, Pasupala; SUBASHINI, Radhakrishnan. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 7, p. 257–270, Jul. 2016a. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.07.001>.

ANSORGE-SCHUMACHER, Marion B.; THUM, Oliver. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, vol. 42, no. 15, p. 6475, 2013. <https://doi.org/10.1039/c3cs35484a>.

ATTIQUE, Syed Awais; QURAT UL AIN; HUSSAIN, Nazim; BILAL, Muhammad; IQBAL, Hafiz M.N. Enzyme immobilization approaches. **Biocatalyst Immobilization**. Elsevier, 2023. p. 37–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91317-1.00007-4>.

AVACHAT, Amelia M.; SHROTRIYA, Shilpa N. Chapter 16. Tamarind Seed Polysaccharide in Novel Drug Delivery and Biomedical Applications, 2022. p. 445–496. <https://doi.org/10.1039/9781839166235-00445>.

AZAD, Salim. Tamarindo— Tamarindus indica. **Exotic Fruits**. Elsevier, 2018. p. 403–412. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00055-1>.

BADGUJAR, Kirtikumar Chandulal; BHANAGE, Bhalchandra Mahadeo. The combine use of ultrasound and lipase immobilized on co-polymer matrix for efficient biocatalytic application studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 122, p. 255–264, Dec. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.012>.

BALAKRISHNAN, Bhavya; SAROJINI, Balladka Kunhanna; KODOTH, Arun Krishna; DAYANANDA, Bikrodi Sesappa; VENKATESHA, Ranjitha. Fabrication and characterization of tamarind seed gum based novel hydrogel for the targeted delivery of omeprazole magnesium. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 258, p. 128758, Feb. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128758>.

BARBOSA, Oveimar; TORRES, Rodrigo; ORTIZ, Claudia; BERENGUER-MURCIA, Ángel; RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, vol. 14, no. 8, p. 2433–2462, 12 Aug. 2013. <https://doi.org/10.1021/bm400762h>.

BAYRAMOGLU, Gulay; CELIKBICAK, Omur; KILIC, Murat; YAKUP ARICA, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. **Food Chemistry**, vol. 366, p. 130699, Jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130699>.

BEN SALAH, Riadh; GHAMGHUI, Hanen; MILED, Nabil; MEJDOUB, Hafedh; GARGOURI, Youssef. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, vol. 103, no. 4, p. 368–372, Apr. 2007. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.368>.

BRANDÃO JÚNIOR, João; ANDRADE DO NASCIMENTO, Jean Gleison; FRANÇA SILVA, Michael Pablo; LIMA BRANDÃO, Eliane de Aquino; DE CASTRO BIZERRA, Viviane; DOS SANTOS, Kaiany Moreira; SERPA, Juliana de França; SANTOS, José Cleiton Sousa dos; DA FONSECA, Aluísio Marques; VASCONCELOS DE OLIVEIRA, Diego Lomonaco; SOUZA, Maria Cristiane Martins de. Performance of Eversa Transform 2.0 Lipase in Ester Production Using Babassu Oil (*Orbignya* sp.) and Tucuman

Oil (*Astrocaryum vulgare*): A Comparative Study between Liquid and Immobilized Forms in Fe₃O₄ Nanoparticles. **Catalysts**, vol. 13, no. 3, p. 571, 11 Mar. 2023. <https://doi.org/10.3390/catal13030571>.

C. WANCURA, João H.; TRES, Marcus V.; JAHN, Sérgio L.; DE OLIVEIRA, José Vladimir. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, vol. 67, no. 4, p. 648–667, 11 Jul. 2020. <https://doi.org/10.1002/bab.1835>.

CASAS-GODOY, Leticia; DUQUESNE, Sophie; BORDES, Florence; SANDOVAL, Georgina; MARTY, Alain. Lipases: An Overview, 2012. p. 3–30. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-600-5_1.

CAVALCANTE, Francisco Thálysson Tavares; DA FONSECA, Aluisio Marques; HOLANDA ALEXANDRE, Jeferson Yves Nunes; DOS SANTOS, José C.S. A stepwise docking and molecular dynamics approach for enzymatic biolubricant production using Lipase Eversa® Transform as a biocatalyst. **Industrial Crops and Products**, vol. 187, p. 115450, Nov. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115450>.

CAVALCANTE, Francisco Thálysson Tavares; NETO, Francisco Simao; RAFAEL DE AGUIAR FALCÃO, Italo; ERICK DA SILVA SOUZA, José; DE MOURA JUNIOR, Lourembergue Saraiva; DA SILVA SOUSA, Patrick; ROCHA, Thales Guimaraes; DE SOUSA, Isamayra Germano; DE LIMA GOMES, Pedro Henrique; DE SOUZA, Maria Cristiane Martins; DOS SANTOS, José C.S. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, vol. 288, p. 119577, Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119577>.

CAVALCANTI, Elisa D.C.; AGUIEIRAS, Érika C.G.; DA SILVA, Priscila R.; DUARTE, Jaqueline G.; CIPOLATTI, Eliane P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; DA SILVA, José André C.; FREIRE, Denise M.G. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, vol. 215, p. 705–713, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.119>.

CHANDRA, Prem; ENESPA; SINGH, Ranjan; ARORA, Pankaj Kumar. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, vol. 19, no. 1, p. 169, 26 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8>.

CHANG, Mun Yuen; CHAN, Eng-Seng; SONG, Cher Pin. 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**, vol. 283, p. 119266, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119266>.

CHAPMAN, Jordan; ISMAIL, Ahmed E.; DINU, Cerasela Zoica. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, vol. 8, no. 6, p. 238, 5 Jun. 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8060238>.

CHELU, Mariana; MUSUC, Adina Magdalena. Polymer Gels: Classification and Recent Developments in Biomedical Applications. **Gels**, vol. 9, no. 2, p. 161, 17 Feb. 2023. <https://doi.org/10.3390/gels9020161>.

CHEN, Hui; SIMOSKA, Olja; LIM, Koun; GRATTIERI, Matteo; YUAN, Mengwei; DONG, Fangyuan; LEE, Yoo Seok; BEAVER, Kevin; WELIWATTE, Samali; GAFFNEY, Erin M.; MINTEER, Shelley D. Fundamentals, Applications, and Future Directions of Bioelectrocatalysis. **Chemical Reviews**, vol. 120, no. 23, p. 12903–12993, 9 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00472>.

CHEN, Jyh-Ping. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, vol. 82, no. 4, p. 404–407, Jan. 1996. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89160-4](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89160-4).

CHERRY, Joel R; FIDANTSEF, Ana L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 14, no. 4, p. 438–443, Aug. 2003. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00099-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00099-5).

CHOWDARY, G.V.; RAMESH, M.N.; PRAPULLA, S.G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis.

Process Biochemistry, vol. 36, no. 4, p. 331–339, Nov. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00218-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00218-1).

CLARK, James H. Solid Acids for Green Chemistry. **Accounts of Chemical Research**, vol. 35, no. 9, p. 791–797, 1 Sep. 2002. <https://doi.org/10.1021/ar010072a>.

CUTLAN, Rhys; DE ROSE, Simone; ISUPOV, Michail N.; LITTLECHILD, Jennifer A.; HARMER, Nicholas J. Using enzyme cascades in biocatalysis: Highlight on transaminases and carboxylic acid reductases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, vol. 1868, no. 2, p. 140322, Feb. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2019.140322>.

DA S. MOREIRA, Katerine; BARROS DE OLIVEIRA, André Luiz; SARAIVA DE MOURA JÚNIOR, Lourembergue; GERMANO DE SOUSA, Isamayra; LUTHIERRE GAMA CAVALCANTE, Antonio; SIMÃO NETO, Francisco; BUSSENS RODRIGUES VALÉRIO, Roberta; VALÉRIO CHAVES, Anderson; DE SOUSA FONSECA, Thiago; MORAIS VIEIRA CRUZ, Daniel; VIEIRA LIMA, Gledson; DE OLIVEIRA, Gabriel Paixão; DE SOUZA, Maria Cristiane Martins; BASÍLIO ALMEIDA FECHINE, Pierre; DE MATTOS, Marcos Carlos; MARQUES DA FONSECA, Aluísio; DOS SANTOS, José C.S. 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**, vol. 177, p. 223–244, Jan. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2021.10.033>.

DAIHA, Karina de Godoy; ANGELI, Renata; DE OLIVEIRA, Sabrina Dias; ALMEIDA, Rodrigo Volcan. Are Lipases Still Important Biocatalysts? A Study of Scientific Publications and Patents for Technological Forecasting. **PLOS ONE**, vol. 10, no. 6, p. e0131624, 25 Jun. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131624>.

DANGE, P. N.; SHARMA, A.; RATHOD, V. K. Synthesis of Methyl Butyrate Using Heterogeneous Catalyst: Kinetic Studies. **Catalysis Letters**, vol. 144, no. 9, p. 1537–1546, 27 Sep. 2014. <https://doi.org/10.1007/s10562-014-1313-6>.

DANGE, P.N.; KULKARNI, A.V.; RATHOD, V.K. Ultrasound assisted synthesis of methyl butyrate using heterogeneous catalyst. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 26, p. 257–264, Sep. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.014>.

DAS, Surojeet; KUMAR, Vivek; TIWARI, Rini; SINGH, Leena; SINGH, Sachidanand. RECENT ADVANCES IN HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, vol. 11, no. 11, p. 62, 7 Nov. 2018. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2018.v11i11.27921>.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, vol. 3, no. 1, p. 1–9, 6 Feb. 2013a. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DATTA, Sumitra; CHRISTENA, L. Rene; RAJARAM, Yamuna Rani Sriramulu. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, vol. 3, no. 1, p. 1–9, 6 Feb. 2013b. <https://doi.org/10.1007/s13205-012-0071-7>.

DAVE, Rachna; MADAMWAR, Datta. *Candida rugosa* lipase immobilized in Triton-X100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis. **Process Biochemistry**, vol. 43, no. 1, p. 70–75, Jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2007.10.012>.

DAVE, Rachna; MADAMWAR, Datta. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. **Process Biochemistry**, vol. 41, no. 4, p. 951–955, Apr. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2005.10.019>.

DE ALMEIDA, Janaina Marques; MOURE, Vivian Rotuno; MÜLLER-SANTOS, Marcelo; DE SOUZA, Emanuel Maltempi; PEDROSA, Fábio Oliveira; MITCHELL, David Alexander; KRIEGER, Nadia. Tailoring recombinant lipases: keeping the His-tag favors esterification reactions, removing it favors hydrolysis reactions. **Scientific Reports**, vol. 8, no. 1, p. 10000, 3 Jul. 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27579-8>.

DE HARO, Juan Carlos; GARRIDO, Maria del Prado; PÉREZ, Ángel; CARMONA, Manuel; RODRÍGUEZ, Juan Francisco. Full conversion of oleic acid to estolides esters, biodiesel and choline carboxylates in three easy steps. **Journal of Cleaner Production**, vol. 184, p. 579–585, May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.190>.

DE OLIVEIRA, Ulisses M. F.; LIMA DE MATOS, Leonardo J. B.; DE SOUZA, Maria Cristiane M.; PINHEIRO, Bruna B.; DOS SANTOS, José C. S.; GONÇALVES, Luciana R. B. Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, vol. 46, no. 1, p. 597–608, 3 Feb. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11033-018-4514-z>.

DE SOUZA, Ticiane C.; DE SOUSA FONSECA, Thiago; DE SOUSA SILVA, Juciane; LIMA, Paula J. M.; NETO, Carlos A. C. G.; MONTEIRO, Rodolpho R. C.; ROCHA, Maria Valderez P.; DE MATTOS, Marcos C.; DOS SANTOS, José C. S.; GONÇALVES, Luciana R. B. 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**, vol. 43, no. 12, p. 2253–2268, 28 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02411-8>.

DENG, Zexing; WANG, Hong; MA, Peter X.; GUO, Baolin. Self-healing conductive hydrogels: preparation, properties and applications. **Nanoscale**, vol. 12, no. 3, p. 1224–1246, 2020. <https://doi.org/10.1039/C9NR09283H>.

DIAS, Arthur Luiz Baião; DOS SANTOS, Philipe; MARTÍNEZ, Julian. Supercritical CO₂ technology applied to the production of flavor ester compounds through lipase-catalyzed reaction: A review. **Journal of CO₂ Utilization**, vol. 23, p. 159–178, Jan. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jcou.2017.11.011>.

DIAS, Suzana F.; VILAS-BOAS, L.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, M. M. R. Production of Ethyl Butyrate by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Polyurethane. **Biocatalysis**, vol. 5, no. 1, p. 21–34, 11 Jan. 1991. <https://doi.org/10.3109/10242429109014852>.

DOS SANTOS, José C.S.; BONAZZA, Horacio L.; DE MATOS, Leonardo J.B.L.; CARNEIRO, Elizabete A.; BARBOSA, Oveimar; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana R.B.; DE SANT'ANA, Hosiberto B.; SANTIAGO-AGUIAR, Rílvia S. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, vol. 14, p. 16–26, Mar. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.003>.

ERGAN, F.; TRANI, M.; ANDRÉ, G. Use of lipases in multiphasic systems solely composed of substrates. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, vol. 68, no. 6, p. 412–417, Jun. 1991. <https://doi.org/10.1007/BF02663758>.

ESIMBEKOVA, Elena N.; TORGASHINA, Irina G.; NEMTSEVA, Elena V.; KRATASYUK, Valentina A. Enzymes Immobilized into Starch- and Gelatin-Based Hydrogels: Properties and Application in Inhibition Assay. **Micromachines**, vol. 14, no. 12, p. 2217, 8 Dec. 2023. <https://doi.org/10.3390/mi14122217>.

FACIN, Bruno; QUINTO, Ernestina; VALERIO, Alexsandra; OLIVEIRA, Débora; OLIVEIRA, Jose; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria. Strategies for the Immobilization of Eversa® Transform 2.0 Lipase and Application for Phospholipid Synthesis. **Catalysts**, vol. 11, no. 10, p. 1236, 14 Oct. 2021. <https://doi.org/10.3390/catal11101236>.

FAHIM, Yosri A.; EL-KHAWAGA, Ahmed M.; SALLAM, Reem M.; ELSAYED, Mohamed A.; ASSAR, Mohamed Farag Ali. Immobilized lipase enzyme on green synthesized magnetic nanoparticles using Psidium guava leaves for dye degradation and antimicrobial activities. **Scientific Reports**, vol. 14, no. 1, p. 8820, 17 Apr. 2024. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-58840-y>.

FEDERSEL, Hans-Jürgen; MOODY, Thomas S.; TAYLOR, Steve J.C. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. **Molecules**, vol. 26, no. 9, p. 2822, 10 May 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26092822>.

FERREIRA GONÇALVES, Gabriel Ramos; RAMOS GANDOLFI, Olga Reinert; BRITO, Mylena Junqueira Pinto; BONOMO, Renata Cristina Ferreira; DA COSTA ILHÉU FONTAN, Rafael; VELOSO, Cristiane Martins. Immobilization of porcine

pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, vol. 111, p. 114–123, Dec. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.10.027>.

FERREIRA, N.N.; FERREIRA, L.M.B.; CARDOSO, V.M.O.; BONI, F.I.; SOUZA, A.L.R.; GREMIÃO, M.P.D. Recent advances in smart hydrogels for biomedical applications: From self-assembly to functional approaches. **European Polymer Journal**, vol. 99, p. 117–133, Feb. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2017.12.004>.

FORESTI, M.L.; ERRAZU, A.; FERREIRA, M.L. Effect of several reaction parameters in the solvent-free ethyl oleate synthesis using *Candida rugosa* lipase immobilised on polypropylene. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 25, no. 1, p. 69–77, Aug. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.04.002>.

FORESTI, M.L.; FERREIRA, M.L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 40, no. 4, p. 769–777, Mar. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.06.009>.

FORTI, Luca; CRAMAROSSA, Maria R.; FILIPPUCCI, Sara; TASSELLI, Giorgia; TURCHETTI, Benedetta; BUZZINI, Pietro. Nonconventional Yeast-Promoted Biotransformation for the Production of Flavor Compounds. **Natural and Artificial Flavoring Agents and Food Dyes**. Elsevier, 2018. p. 165–187. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811518-3.00006-5>.

FRAGA, Fernanda Cristina; VALÉRIO, Alexsandra; DE OLIVEIRA, Vanessa Almeida; DI LUCCIO, Marco; DE OLIVEIRA, Débora. Effect of magnetic field on the Eversa® Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 122, p. 653–658, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.171>.

FRAGA, Jully L.; SOUZA, Camila P. L.; PEREIRA, Adejanildo da S.; AGUIEIRAS, Erika C. G.; DE SILVA, Laís O.; TORRES, Alexandre G.; FREIRE, Denise G.; AMARAL, Priscilla F. F. Palm oil wastes as feedstock for lipase production by *Yarrowia*

lipolytica and biocatalyst application/reuse. **3 Biotech**, vol. 11, no. 4, p. 191, 25 Apr. 2021. <https://doi.org/10.1007/s13205-021-02748-1>.

FRIEDRICH, John L. R.; PEÑA, Fernanda P.; GARCIA-GALAN, Cristina; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; AYUB, Marco A. Z.; RODRIGUES, Rafael C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, vol. 88, no. 6, p. 1089–1095, 15 Jun. 2013. <https://doi.org/10.1002/jctb.3945>.

GANTZ, Maximilian; ALEKU, Godwin A.; HOLLFELDER, Florian. Ultrahigh-throughput screening in microfluidic droplets: a faster route to new enzymes. **Trends in Biochemical Sciences**, vol. 47, no. 5, p. 451–452, May 2022. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2021.11.001>.

GARLAPATI, Vijay Kumar; BANERJEE, Rintu. Solvent-Free Synthesis of Flavour Esters through Immobilized Lipase Mediated Transesterification. **Enzyme Research**, vol. 2013, p. 1–6, 30 May 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/367410>.

GARNER, John; PARK, Kinam. Chemically Modified Natural Polysaccharides to Form Gels. **Polysaccharides**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1555–1582. https://doi.org/10.1007/978-3-319-16298-0_31.

GERMANO DE SOUSA, Isamayra; VALÉRIO CHAVES, Anderson; DE OLIVEIRA, André Luiz Barros; DA SILVA MOREIRA, Katerine; GONÇALVES DE SOUSA JUNIOR, Paulo; SIMÃO NETO, Francisco; CRISTINA FREITAS DE CARVALHO, Simone; BUSSONS RODRIGUES VALÉRIO, Roberta; VIEIRA LIMA, Gledson; SANDERS LOPES, Ada Amélia; MARTINS DE SOUZA, Maria Cristiane; DA FONSECA, Aluísio Marques; FECHINE, Pierre Basílio Almeida; DE MATTOS, Marcos Carlos; DOS SANTOS, José C. S. A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, vol. 42, no. 2, p. 151–172, 3 Mar. 2024. <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2144263>.

GHORI, M. I; IQBAL, M. J; HAMEED, A. Characterization of a novel lipase from *Bacillus* sp. isolated from tannery wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, vol. 42, no. 1, p. 22–29, Mar. 2011. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000100003>.

GRAVEL, Alexia; MARCINIAK, Alice; COUTURE, Manon; DOYEN, Alain. Effects of Hexane on Protein Profile, Solubility and Foaming Properties of Defatted Proteins Extracted from *Tenebrio molitor* Larvae. **Molecules**, vol. 26, no. 2, p. 351, 12 Jan. 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26020351>.

GROB, Sascha; HASSE, Hans. Reaction Kinetics of the Homogeneously Catalyzed Esterification of 1-Butanol with Acetic Acid in a Wide Range of Initial Compositions. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, vol. 45, no. 6, p. 1869–1874, 1 Mar. 2006. <https://doi.org/10.1021/ie050789s>.

GRUNWALD, Peter. Immobilized Biocatalysts. **Catalysts**, vol. 8, no. 9, p. 386, 9 Sep. 2018. <https://doi.org/10.3390/catal8090386>.

HEMMATI, Khadijeh; GHAEMY, Mousa. Synthesis of new thermo/pH sensitive drug delivery systems based on tragacanth gum polysaccharide. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 87, p. 415–425, Jun. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.005>.

HEMSHEKHAR, Mahadevappa; KEMPARAJU, Kempaiah; GIRISH, Kesturu Subbaiah. Tamarind (*Tamarindus indica*) Seeds. **Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention**. Elsevier, 2011. p. 1107–1114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375688-6.10131-8>.

HO, Tzu-Chuan; CHANG, Chin-Chuan; CHAN, Hung-Pin; CHUNG, Tze-Wen; SHU, Chih-Wen; CHUANG, Kuo-Pin; DUH, Tsai-Hui; YANG, Ming-Hui; TYAN, Yu-Chang. Hydrogels: Properties and Applications in Biomedicine. **Molecules**, vol. 27, no. 9, p. 2902, 2 May 2022. <https://doi.org/10.3390/molecules27092902>.

HOMAEI, Ahmad Abolpour; SARIRI, Reyhaneh; VIANELLO, Fabio; STEVANATO, Roberto. Enzyme immobilization: an update. **Journal of Chemical Biology**, vol. 6, no. 4, p. 185–205, 29 Oct. 2013. <https://doi.org/10.1007/s12154-013-0102-9>.

HOU, C.T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Encyclopedia of Microbiology**. Elsevier, 2009. p. 385–392. <https://doi.org/10.1016/B978-012373944-5.00153-X>.

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**. 2022. 1–124 f. Dissertation – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - unilab, Redenção - CE, 2022. Available at: <https://repositorio.unilab.edu.br/jspui/handle/123456789/repositorio.unilab.edu.br/jspui/handle/123456789/3155>. Accessed on: 11 Jun. 2024.

ISLAM, Mohammad R.; OYEN, Michelle L. Mechanical characterization of hydrogels. **The Mechanics of Hydrogels**. Elsevier, 2022. p. 1–24. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102862-9.00014-2>.

JHA, Madhav Kumar; DAS, Partha Pratim; GUPTA, Sumit; CHAUDHARY, Vijay; GUPTA, Pallav. Complementing the circular economy with a life cycle assessment of sustainable hydrogels and their future prospects. **Sustainable Hydrogels**. Elsevier, 2023. p. 489–503. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91753-7.00010-7>.

JIN, Zi; NTWALI, Janvier; HAN, Shuang-Yan; ZHENG, Sui-Ping; LIN, Ying. Production of flavor esters catalyzed by CALB-displaying *Pichia pastoris* whole-cells in a batch reactor. **Journal of Biotechnology**, vol. 159, no. 1–2, p. 108–114, May 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.02.013>.

KAPOOR, Manali; GUPTA, Munishwar Nath. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, vol. 47, no. 4, p. 555–569, Apr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.01.011>.

KAUR, Gurpreet; MAHAJAN, Mohit; BASSI, Pallavi. Derivatized Polysaccharides: Preparation, Characterization, and Application as Bioadhesive Polymer for Drug Delivery. **International Journal of Polymeric Materials**, vol. 62, no. 9, p. 475–481, 20 May 2013. <https://doi.org/10.1080/00914037.2012.734348>.

KAUR, Kamaljit; KAUSHAL, Pragati. Enzymes as Analytical Tools for the Assessment of Food Quality and Food Safety. **Advances in Enzyme Technology**. Elsevier, 2019. p. 273–292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00010-8>.

KAUR, Manpreet; MEHTA, Akshita; GUPTA, Reena. Synthesis of Methyl Butyrate Catalyzed by Lipase from *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Oleo Science**, vol. 68, no. 10, p. 989–993, 2019. <https://doi.org/10.5650/jos.ess19125>.

KERAMATI, Sina; FERDOWSI, Milad; ZAMIR, Seyed Morteza. Compounds interactions during simultaneous biodegradation of hydrophobic n-hexane and hydrophilic methanol vapors in one- and two-liquid phase conditions. **Process Safety and Environmental Protection**, vol. 147, p. 283–291, Mar. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.09.040>.

KIM, Min Hoo; AN, Seulji; WON, Keehoon; KIM, Hyung Joo; LEE, Sang Hyun. Entrapment of enzymes into cellulose–biopolymer composite hydrogel beads using biocompatible ionic liquid. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 75, p. 68–72, Mar. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.011>.

KIMBERLE, Paiva dos Santos; CAROLINA, Mellinger-Silva; ANA, Iraidy Santa Brígida; LUCIANA, Rocha Barros Gonçalves. Modifying alcalase activity and stability by immobilization onto chitosan aiming at the production of bioactive peptides by hydrolysis of tilapia skin gelatin. **Process Biochemistry**, vol. 97, p. 27–36, Oct. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.06.019>.

KOUACHI. POTENTIAL APPLICATIONS OF CHITOSAN NANOPARTICLES AS NOVEL SUPPORT IN ENZYME IMMOBILIZATION. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, vol. 8, no. 4, p. 203–219, 1 Apr. 2012. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2012.203.219>.

KOVALENKO, Galina; PERMINOVA, Larisa; PYKHTINA, Maria; BEKLEMISHEV, Anatoly. Lipase-active heterogeneous biocatalysts for enzymatic synthesis of short-chain aroma esters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 36, p. 102124, Sep. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102124>.

KUMAR, Ashok; DHAR, Kartik; KANWAR, Shamsheer Singh; ARORA, Pankaj Kumar. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**, vol. 18, no. 1, p. 2, 13 Dec. 2016. <https://doi.org/10.1186/s12575-016-0033-2>.

LANG, P.; MASCI, G.; DENTINI, M.; CRESCENZI, V.; COOKE, D.; GIDLEY, M.J.; FANUTTI, C.; REID, J.S.G. Tamarind seed polysaccharide: preparation, characterisation and solution properties of carboxylated, sulphated and alkylaminated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, vol. 17, no. 3, p. 185–198, Jan. 1992. [https://doi.org/10.1016/0144-8617\(92\)90003-9](https://doi.org/10.1016/0144-8617(92)90003-9).

LEAKEY, Roger R.B. Potential for Novel Food Products From Agroforestry Trees. **Multifunctional Agriculture**. Elsevier, 2017. p. 71–86. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805356-0.00007-6>.

LI, Chenghao; NI, Lei; CHEN, Qiang; JIANG, Juncheng; ZHOU, Kuibin. Temperature Control of Exothermic Reactions Using n-Octadecane@MF Resin microPCMs Based on Esterification Reactions. **Processes**, vol. 10, no. 2, p. 239, 26 Jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/pr10020239>.

LI, De-Qiang; XU, Yang-Lei; XU, Feng; LI, Jun. Eco-friendly and biodegradable cellulose hydrogels. **Sustainable Hydrogels**. Elsevier, 2023. p. 197–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91753-7.00002-8>.

LIN, Shih-Ho; PAPADAKIS, Christine M.; KANG, Jia-Jhen; LIN, Jhih-Min; HSU, Shan-hui. Injectable Phenolic-Chitosan Self-Healing Hydrogel with Hierarchical Micelle Architectures and Fast Adhesiveness. **Chemistry of Materials**, vol. 33, no. 11, p. 3945–3958, 8 Jun. 2021. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.1c00028>.

LV, Liangliang; DAI, Lingmei; DU, Wei; LIU, Dehua. Progress in Enzymatic Biodiesel Production and Commercialization. **Processes**, vol. 9, no. 2, p. 355, 15 Feb. 2021. <https://doi.org/10.3390/pr9020355>.

MAGDI M. MOSSOBA; JOHN KRAMER. **Official Methods for Determination of trans Fat, Second Edition**. 2nd ed., 2010.

MAGHRABY, Yasmin R.; EL-SHABASY, Rehan M.; IBRAHIM, Ahmed H.; AZZAZY, Hassan Mohamed El-Said. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, vol. 8, no. 6, p. 5184–5196, 14 Feb. 2023. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>.

MALI, Kailas K.; DHAWALE, Shashikant C.; DIAS, Remeth J. Extraction, Characterization and Functionalization of Tamarind Gum. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, vol. 12, no. 4, p. 1745, 2019. <https://doi.org/10.5958/0974-360X.2019.00292.0>.

MALI, Kailas K.; DHAWALE, Shashikant C.; DIAS, Remeth J. Synthesis and characterization of hydrogel films of carboxymethyl tamarind gum using citric acid. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 105, p. 463–470, Dec. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.058>.

MANTHA, Somasundar; PILLAI, Sangeeth; KHAYAMBASHI, Parisa; UPADHYAY, Akshaya; ZHANG, Yuli; TAO, Owen; PHAM, Hieu M.; TRAN, Simon D. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. **Materials**, vol. 12, no. 20, p. 3323, 12 Oct. 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>.

MARIA CRISTIANE MARTINS DE SOUZA. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. 2013. 1–88 f. Tese – Universidade Federal do Ceará - UFC, Fortaleza - CE, 2013. Available at: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/5041>. Accessed on: 11 Jun. 2024.

MARTINS, Andréa B.; DA SILVA, Alexandre M.; SCHEIN, Mirela F.; GARCIA-GALAN, Cristina; ZÁCHIA AYUB, Marco A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto;

RODRIGUES, Rafael C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 105, p. 18–25, Jul. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2014.03.021>.

MARTINS, Andréa B.; GRAEBIN, Natália G.; LORENZONI, André S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; AYUB, Marco A.Z.; RODRIGUES, Rafael C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, vol. 46, no. 12, p. 2311–2316, Dec. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2011.09.011>.

MEENA, Priyanka; SINGH, Poonam; WARKAR, Sudhir G. Development and assessment of carboxymethyl tamarind kernel gum-based pH-responsive hydrogel for release of diclofenac sodium. **European Polymer Journal**, vol. 197, p. 112340, Oct. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112340>.

MEHANDIA, Seema; SHARMA, S.C.; ARYA, Shailendra Kumar. Immobilization of laccase on chitosan-clay composite beads to improve its catalytic efficiency to degrade industrial dyes. **Materials Today Communications**, vol. 25, p. 101513, Dec. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101513>.

MEHTA, Piyush; MAHADIK, Kakasaheb; KADAM, Shivajirao; DHAPTE-PAWAR, Vividha. Advanced applications of green hydrogels in drug delivery systems. **Applications of Advanced Green Materials**. Elsevier, 2021. p. 89–130. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820484-9.00004-0>.

MENDES, Adriano A.; DE CASTRO, Heizir F.; DE S. RODRIGUES, Dasciana; ADRIANO, Wellington S.; TARDIOLI, Paulo W.; MAMMARELLA, Enrique J.; DE C. GIORDANO, Roberto; DE L. C. GIORDANO, Raquel. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, vol. 38, no. 8, p. 1055–1066, 5 Aug. 2011. <https://doi.org/10.1007/s10295-010-0880-9>.

MEYER, Johanna; MEYER, Lars-Erik; KARA, Selin. Enzyme immobilization in hydrogels: A perfect liaison for efficient and sustainable biocatalysis. **Engineering in Life Sciences**, vol. 22, no. 3–4, p. 165–177, 21 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1002/elsc.202100087>.

MEYER, Lars-Erik; VON LANGERMANN, Jan; KRAGL, Udo. Recent developments in biocatalysis in multiphasic ionic liquid reaction systems. **Biophysical Reviews**, vol. 10, no. 3, p. 901–910, 27 Jun. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12551-018-0423-6>.

MIBIELLI, Guilherme M.; FAGUNDES, Ana P.; BENDER, João P.; VLADIMIR OLIVEIRA, J. Lab and pilot plant FAME production through enzyme-catalyzed reaction of low-cost feedstocks. **Bioresource Technology Reports**, vol. 5, p. 150–156, Feb. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2019.01.013>.

MIGUEL JÚNIOR, José; MATTOS, Fernanda R.; COSTA, Guilherme R.; ZURLO, Ana B. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A. Improved Catalytic Performance of Lipase Eversa® Transform 2.0 via Immobilization for the Sustainable Production of Flavor Esters—Adsorption Process and Environmental Assessment Studies. **Catalysts**, vol. 12, no. 11, p. 1412, 11 Nov. 2022. <https://doi.org/10.3390/catal12111412>.

MILAŠINOVIĆ, Nikola; MILOSAVLJEVIĆ, Nedeljko; FILIPOVIĆ, Jovanka; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Zorica; KRUŠIĆ, Melina Kalagasidis. Synthesis, characterization and application of poly(N-isopropylacrylamide-co-itaconic acid) hydrogels as supports for lipase immobilization. **Reactive and Functional Polymers**, vol. 70, no. 10, p. 807–814, Oct. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.reactfunctpolym.2010.07.017>.

MISHRA, Anuradha; MALHOTRA, Annu Vij. Tamarind xyloglucan: a polysaccharide with versatile application potential. **Journal of Materials Chemistry**, vol. 19, no. 45, p. 8528, 2009. <https://doi.org/10.1039/b911150f>.

MISHRA, Sumit; RANI, Priti; SEN, Gautam; DEY, Kartick Prasad. Preparation, Properties and Application of Hydrogels: A Review, 2018. p. 145–173. https://doi.org/10.1007/978-981-10-6077-9_6.

MOHAMAD, Nur Royhaila; MARZUKI, Nur Haziqah Che; BUANG, Nor Aziah; HUYOP, Fahrul; WAHAB, Roswanira Abdul. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, vol. 29, no. 2, p. 205–220, 4 Mar. 2015. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1008192>.

MOKHTAR, Nur Fathiah; ABD. RAHMAN, Raja Noor Zaliha Raja; MUHD NOOR, Noor Dina; MOHD SHARIFF, Fairalniza; MOHAMAD ALI, Mohd Shukuri. The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. **Catalysts**, vol. 10, no. 7, p. 744, 4 Jul. 2020. <https://doi.org/10.3390/catal10070744>.

MOLINA-GUTIÉRREZ, María; ALCARAZ, Lorena; LÓPEZ, Félix A.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, Leonor; MARTÍNEZ, María Jesús; PRIETO, Alicia. Immobilized Forms of the *Ophiostoma piceae* Lipase for Green Synthesis of Biodiesel. Comparison with Eversa Transform 2.0 and Cal A. **Journal of Fungi**, vol. 7, no. 10, p. 822, 30 Sep. 2021. <https://doi.org/10.3390/jof7100822>.

MONTEIRO, Rodolpho R. C.; LIMA, Paula J. M.; PINHEIRO, Bruna B.; FREIRE, Tiago M.; DUTRA, Lillian M. U.; FECHINE, Pierre B. A.; GONÇALVES, Luciana R. B.; DE SOUZA, Maria C. M.; DOS SANTOS, José C. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 20, no. 16, p. 4018, 17 Aug. 2019. <https://doi.org/10.3390/ijms20164018>.

MONTEIRO, Rodolpho R. C.; NETO, Davino M. Andrade; FECHINE, Pierre B. A.; LOPES, Ada A. S.; GONÇALVES, Luciana R. B.; DOS SANTOS, José C. S.; DE SOUZA, Maria C. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. 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, vol. 20, no. 22, p. 5807, 19 Nov. 2019.
<https://doi.org/10.3390/ijms20225807>.

MONTEIRO, Rodolpho R.C.; ARANA-PEN˜A, Sara; DA ROCHA, Thays N.; MIRANDA, Letícia P.; BERENGUER-MURCIA, ˆngel; TARDIOLI, Paulo W.; DOS SANTOS, José C.S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, vol. 164, p. 1566–1587, Feb. 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.071>.

MUNIM, Somayyah Abdul; RAZA, Zulfiqar Ali. Poly(lactic acid) based hydrogels: formation, characteristics and biomedical applications. **Journal of Porous Materials**, vol. 26, no. 3, p. 881–901, 16 Jun. 2019. <https://doi.org/10.1007/s10934-018-0687-z>.

MURARIU, Marius; DUBOIS, Philippe. PLA composites: From production to properties. **Advanced Drug Delivery Reviews**, vol. 107, p. 17–46, Dec. 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.addr.2016.04.003>.

MUSHTAQ, Farwa; RAZA, Zulfiqar Ali; BATOOL, Syeda Rubab; ZAHID, Muhammad; ONDER, Ozgun Can; RAFIQUE, Ammara; NAZEER, Muhammad Anwaar. Preparation, properties, and applications of gelatin-based hydrogels (GHs) in the environmental, technological, and biomedical sectors. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 218, p. 601–633, Oct. 2022.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.168>.

NETO, Francisco Sim˜o; FERNANDES DE MELO NETA, Maria Marliete; SALES, Misael Bessa; SILVA DE OLIVEIRA, Francisco Arisson; DE CASTRO BIZERRA, Viviane; SANDERS LOPES, Ada Am lia; DE SOUSA RIOS, Maria Alexsandra; SANTOS, José Cleiton Sousa dos. Research Progress and Trends on Utilization of Lignocellulosic Residues as Supports for Enzyme Immobilization via Advanced Bibliometric Analysis. **Polymers**, vol. 15, no. 9, p. 2057, 26 Apr. 2023.
<https://doi.org/10.3390/polym15092057>.

NORDBLAD, Mathias; ADLERCREUTZ, Patrick. Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Biotechnology**, vol. 133, no. 1, p. 127–133, Jan. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2007.09.002>.

OKURA, Nicole S.; SABI, Guilherme J.; CRIVELLENTI, Marcela C.; GOMES, Raphael A.B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A. 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**, vol. 163, p. 550–561, Nov. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.021>.

ORTIZ, Claudia; FERREIRA, María Luján; BARBOSA, Oveimar; DOS SANTOS, José C. S.; RODRIGUES, Rafael C.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; BRIAND, Laura E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science & Technology**, vol. 9, no. 10, p. 2380–2420, 2019. <https://doi.org/10.1039/C9CY00415G>.

OSADA, Yoshihito; PING GONG, Jian; TANAKA, Yutaka. Polymer Gels. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, vol. 44, no. 1, p. 87–112, 30 Dec. 2004. <https://doi.org/10.1081/MC-120027935>.

OZYILMAZ, Gul; GEZER, Esra. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 64, no. 3–4, p. 140–145, Jul. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.04.013>.

PALUDO, Natalia; ALVES, Joana S.; ALTMANN, Cintia; AYUB, Marco A.Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; RODRIGUES, Rafael C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, vol. 22, p. 89–94, Jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.004>.

PARDO-TAMAYO, Juan S.; ARTEAGA-COLLAZOS, Sebastián; DOMÍNGUEZ-HOYOS, Laura C.; GODOY, César A. Biocatalysts Based on Immobilized Lipases for the Production of Fatty Acid Ethyl Esters: Enhancement of Activity through Ionic Additives and Ion Exchange Supports. **BioTech**, vol. 12, no. 4, p. 67, 18 Dec. 2023. <https://doi.org/10.3390/biotech12040067>.

PARK, Saerom; KIM, Sung Hee; KIM, Ji Hyun; YU, Hyejeong; KIM, Hyung Joo; YANG, Yung-Hun; KIM, Hyungsup; KIM, Yong Hwan; HA, Sung Ho; LEE, Sang Hyun. Application of cellulose/lignin hydrogel beads as novel supports for immobilizing lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 119, p. 33–39, Sep. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.05.014>.

PEREIRA, Adejanildo da S.; DE SOUZA, Aline Habibe; FRAGA, Jully L.; VILLENEUVE, Pierre; TORRES, Alexandre G.; AMARAL, Priscilla F. F. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. **Catalysts**, vol. 12, no. 1, p. 88, 13 Jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>.

PERVEZ, Rashid; RAJKUMAR; OLABIYI, T.I. Nematode problems in major spice crops and their sustainable management. **Nematode Diseases of Crops and their Sustainable Management**. Elsevier, 2023. p. 497–514. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91226-6.00025-0>.

PINHEIRO, Bruna B.; RIOS, Nathalia S.; RODRÍGUEZ AGUADO, Elena; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; FREIRE, Tiago M.; FECHINE, Pierre B.A.; DOS SANTOS, José C.S.; GONÇALVES, Luciana R.B. 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**, vol. 130, p. 798–809, Jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M.M.R.; FERREIRA-DIAS, S. Synthesis of ethyl butyrate in organic media catalyzed by *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams: A kinetic study. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 43, no. 3, p. 327–332, Mar. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2008.11.002>.

PRABHANJAN, H. Studies on Modified Tamarind Kernel Powder. Part I: Preparation and Physicochemical Properties of Sodium Salt of Carboxymethyl Derivatives. **Starch - Stärke**, vol. 41, no. 11, p. 409–414, 26 Jan. 1989. <https://doi.org/10.1002/star.19890411102>.

PRICE, Jason; NORDBLAD, Mathias; MARTEL, Hannah H.; CHRABAS, Brent; WANG, Huali; NIELSEN, Per Munk; WOODLEY, John M. Scale-up of industrial biodiesel production to 40 m³ using a liquid lipase formulation. **Biotechnology and Bioengineering**, vol. 113, no. 8, p. 1719–1728, 25 Aug. 2016. <https://doi.org/10.1002/bit.25936>.

PUBCHEM. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. 2004a. **PubChem Compound Summary for CID 702, Ethanol**. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ethanol>. Accessed on: 11 Jun. 2024.

PUBCHEM. PubChem. Bethesda (MD): National Library of Medicine (USA), National Center for Biotechnology Information. 2004b. **PubChem compound summary for CID 887, methanol**. Available at: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methanol>. Accessed on: 11 Jun. 2024.

RAMOS, Márcio Daniel Nicodemos; MILESSI, Thais Suzane; CANDIDO, Rafael Garcia; MENDES, Adriano Aguiar; AGUIAR, André. Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: Current status and perspectives. **Energy for Sustainable Development**, vol. 68, p. 103–119, Jun. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.esd.2022.03.007>.

RANJIT, Eliza; HAMLET, Stephen; GEORGE, Roy; SHARMA, Ajay; LOVE, Robert M. Biofunctional approaches of wool-based keratin for tissue engineering. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, vol. 7, no. 1, p. 100398, Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2021.10.001>.

RAO, P. S.; BERI, R. M. Acetylation of tamarind seed Jellose. **Proceedings of the Indian Academy of Sciences - Section A**, vol. 42, no. 4, p. 199–203, Oct. 1955. <https://doi.org/10.1007/BF03053508>.

REETZ, Manfred T. Biocatalysis in Organic Chemistry and Biotechnology: Past, Present, and Future. **Journal of the American Chemical Society**, vol. 135, no. 34, p. 12480–12496, 28 Aug. 2013. <https://doi.org/10.1021/ja405051f>.

REIS, Carla; SOUSA, Emerson; SERPA, Juliana; OLIVEIRA, Ravena; OLIVEIRA, Ravena; SANTOS, José. DESIGN OF IMMOBILIZED ENZYME BIOCATALYSTS: DRAWBACKS AND OPPORTUNITIES. **Química Nova**, 2019. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170381>.

REMONATTO, Daniela; DE OLIVEIRA, J. Vladimir; MANUEL GUISAN, J.; DE OLIVEIRA, Débora; NINOW, Jorge; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 185, no. 3, p. 705–716, 3 Jul. 2018. <https://doi.org/10.1007/s12010-017-2683-1>.

REMONATTO, Daniela; MIOTTI JR., Rodney H.; MONTI, Rubens; BASSAN, Juliana C.; DE PAULA, Ariela Veloso. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, vol. 114, p. 1–20, Mar. 2022. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.01.004>.

REMONATTO, Daniela; OLIVEIRA, J. Vladimir; GUISAN, J. Manuel; OLIVEIRA, Débora; NINOW, Jorge; FERNANDEZ-LORENTE, Gloria. Immobilization of Eversa Lipases on Hydrophobic Supports for Ethanolysis of Sunflower Oil Solvent-Free. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, vol. 194, no. 5, p. 2151–2167, 20 May 2022. <https://doi.org/10.1007/s12010-021-03774-8>.

ROBINSON, Peter K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, vol. 59, p. 1–41, 15 Nov. 2015. <https://doi.org/10.1042/bse0590001>.

RODRIGUES, Dasciana S.; MENDES, Adriano A.; ADRIANO, Wellington S.; GONÇALVES, Luciana R.B.; GIORDANO, Raquel. L.C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 51, no. 3–4, p. 100–109, Apr. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2007.11.016>.

RODRIGUES, Rafael C.; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; DOS SANTOS, José C.S.; BERENGUER-MURCIA, Ángel; ALCANTARA, Andres R.; BARBOSA, Oveimar; ORTIZ, Claudia; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, vol. 37, no. 5, p. 746–770, Sep. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

RODRIGUEZ-NOGALES, José M.; ROURA, Elena; CONTRERAS, Elizabeth. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, vol. 40, no. 1, p. 63–68, Jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.11.049>.

ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H.S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, vol. 37, no. 1, p. 42–48, Jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.12.033>.

ROMERO, M.D.; CALVO, L.; ALBA, C.; HABULIN, M.; PRIMOŽIČ, M.; KNEZ, Ž. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, vol. 33, no. 1, p. 77–84, Jan. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2004.05.004>.

SÁ, Amanda Gomes Almeida; MENESES, Alessandra Cristina de; ARAÚJO, Pedro Henrique Hermes de; OLIVEIRA, Débora de. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**, vol. 69, p. 95–105, Nov. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>.

SAIDESWARA RAO, Y.; MARY MATHEW, K. Tamarind. **Handbook of Herbs and Spices**. Elsevier, 2012. p. 512–533. <https://doi.org/10.1533/9780857095688.512>.

SANNINO, Alessandro; DEMITRI, Christian; MADAGHIELE, Marta. Biodegradable Cellulose-based Hydrogels: Design and Applications. **Materials**, vol. 2, no. 2, p. 353–373, 16 Apr. 2009. <https://doi.org/10.3390/ma2020353>.

SANTOS, Nayanne L.; BRAGA, Renata C.; BASTOS, Maria S.R.; CUNHA, Pablyana L.R.; MENDES, Francisco R.S.; GALVÃO, Andrêssa M.M.T.; BEZERRA, Gabryela S.; PASSOS, Antonia A.C. Preparation and characterization of Xyloglucan films extracted from Tamarindus indica seeds for packaging cut-up ‘Sunrise Solo’ papaya. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 132, p. 1163–1175, Jul. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.044>.

SARMA, Y.R.; BABU, K. Nirmal; AZIZ, S. Spices and Aromatics. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**. Elsevier, 2014. p. 211–234. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52512-3.00153-4>.

SCHMIDT, Bernhard V.K.J. Hydrophilic Polymers. **Polymers**, vol. 11, no. 4, p. 693, 16 Apr. 2019. <https://doi.org/10.3390/polym11040693>.

SHAFIQ, Kanza; MAHMOOD, Asif; SALEM-BEKHIT, Mounir M.; SARFRAZ, Rai Muhammad; ALGARNI, Alanood S.; TAHA, Ehab I.; MANSOUR, Ahd A.; AL ZHRANI, Sami; BENGUERBA, Yacine. Development and Optimization of Tamarind Gum- β -Cyclodextrin-g-Poly(Methacrylate) pH-Responsive Hydrogels for Sustained Delivery of Acyclovir. **Pharmaceuticals**, vol. 15, no. 12, p. 1527, 8 Dec. 2022. <https://doi.org/10.3390/ph15121527>.

SHARMA, Shweta; PARMAR, Ankush; MEHTA, S.K. Hydrogels. **Drug Targeting and Stimuli Sensitive Drug Delivery Systems**. Elsevier, 2018. p. 627–672. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813689-8.00016-1>.

SHAW, Gauri S.; UVANESH, K.; GAUTHAM, S.N.; SINGH, Vinay; PRAMANIK, Krishna; BANERJEE, Indranil; KUMAR, Naresh; PAL, Kunal. Development and

characterization of gelatin-tamarind gum/carboxymethyl tamarind gum based phase-separated hydrogels: a comparative study. **Designed Monomers and Polymers**, vol. 18, no. 5, p. 434–450, 4 Jul. 2015. <https://doi.org/10.1080/15685551.2015.1041075>.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, vol. 42, no. 15, p. 6223–6235, 27 Mar. 2013. <https://doi.org/10.1039/C3CS60075K>.

SHI, Wenwen; ZHANG, Dongqin; HAN, Luyao; SHAO, Wanting; LIU, Qimeng; SONG, Bangyu; YAN, Guoqing; TANG, Rupei; YANG, Xuefeng. Supramolecular chitin-based hydrogels with self-adapting and fast-degradation properties for enhancing wound healing. **Carbohydrate Polymers**, vol. 323, p. 121374, Jan. 2024. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2023.121374>.

SHU, Chengliang; CAI, Jin; HUANG, Lei; ZHU, Xiangcheng; XU, Zhinan. Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 72, no. 3–4, p. 139–144, Nov. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.05.011>.

SILVA, J.A.; MACEDO, G.P.; RODRIGUES, D.S.; GIORDANO, R.L.C.; GONÇALVES, L.R.B. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, vol. 60, p. 16–24, Jan. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011>.

SINGH, Nisha; RAJ KUMAR; SACHAN, Pravin Kumar. Kinetic Study of Catalytic Esterification of Butyric Acid and Ethanol over Amberlyst 15. **ISRN Chemical Engineering**, vol. 2013, p. 1–6, 23 Oct. 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/520293>.

SINGH, Vandana; KUMAR, Pramendra. Carboxymethyl tamarind gum–silica nanohybrids for effective immobilization of amylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 70, no. 1–2, p. 67–73, Jun. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.02.006>.

SMITH, A.M.; MOXON, S.; MORRIS, G.A. Biopolymers as wound healing materials. **Wound Healing Biomaterials**. Elsevier, 2016. p. 261–287. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-456-7.00013-1>.

SOUZA, M. C. M. de; SANTOS, K. P. dos; FREIRE, R. M.; BARRETO, A. C. H.; FECHINE, P. B. A.; GONÇALVES, L. R. B. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, vol. 34, no. 3, p. 681–690, Jul. 2017. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150575>.

STANCIU, Lia; DIAZ-AMAYA, Susana. Composite biomaterials. **Introductory Biomaterials**. Elsevier, 2022. p. 149–169. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809263-7.00007-X>.

SUGAHARA, Vanessa Hitomi; VARÉA, Geni da Silva. Immobilization of Beauveria bassiana Lipase on Silica Gel by Physical Adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol. 57, no. 6, p. 842–850, Dec. 2014. <https://doi.org/10.1590/S1516-8913201401358>.

TEIXEIRA, Daniele M.A.; BRAGA, Renata C.; HORTA, Ana C.G.; MOREIRA, Renato A.; DE BRITO, Ana C.F.; MACIEL, Jeanny S.; FEITOSA, Judith P.A.; DE PAULA, Regina C.M. Spondias purpurea Exudate polysaccharide as affinity matrix for the isolation of a galactose-binding-lectin. **Carbohydrate Polymers**, vol. 70, no. 4, p. 369–377, Nov. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2007.04.016>.

TEIXEIRA-SÁ, Daniele M.A.; REICHER, Fany; BRAGA, Renata C.; BELTRAMINI, Leila Maria; DE AZEVEDO MOREIRA, Renato. Isolation of a lectin and a galactoxyloglucan from Mucuna sloanei seeds. **Phytochemistry**, vol. 70, no. 17–18, p. 1965–1972, Dec. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.08.011>.

THANG, Nguyen Hoc; CHIEN, Truong Bach; CUONG, Dang Xuan. Polymer-Based Hydrogels Applied in Drug Delivery: An Overview. **Gels**, vol. 9, no. 7, p. 523, 27 Jun. 2023. <https://doi.org/10.3390/gels9070523>.

TJØRNELUND, Helena D.; VIND, Jesper; BRASK, Jesper; WOODLEY, John M.; PETERS, Günther H.J. *Candida antarctica* lipase B performance in organic solvent at varying water activities studied by molecular dynamics simulations. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, vol. 21, p. 5451–5462, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2023.10.049>.

TRIVEDI, Jignesh H. Synthesis, characterization, and swelling behavior of superabsorbent hydrogel from sodium salt of partially carboxymethylated tamarind kernel powder-g-PAN. **Journal of Applied Polymer Science**, vol. 129, no. 4, p. 1992–2003, 15 Aug. 2013. <https://doi.org/10.1002/app.38910>.

UNDERSTANDING THE BIOCATALYTIC POTENTIAL OF LIPASE FROM RHIZOPUS CHINENSIS. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, vol. 12, no. 3, p. 4230–4260, 14 Aug. 2021. <https://doi.org/10.33263/BRIAC123.42304260>.

URRUTIA, P.; ARRIETA, R.; ALVAREZ, L.; CARDENAS, C.; MESA, M.; WILSON, L. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, vol. 108, p. 674–686, Mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.12.062>.

VAHIDI, S. Hooman; MONHEMI, Hassan; HASSANI SABZEVAR, Bahareh; EFTEKHARI, Mohammad. Electrostatic interactions of enzymes in non-aqueous conditions: insights from molecular dynamics simulations. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, , p. 1–14, 15 Nov. 2023. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2280775>.

VAN DE VELDE, Fred; LOURENÇO, Nídia D.; PINHEIRO, Helena M.; BAKKER, Martin. Carrageenan: A Food-Grade and Biocompatible Support for Immobilisation Techniques. **Advanced Synthesis & Catalysis**, vol. 344, no. 8, p. 815–835, Sep. 2002. [https://doi.org/10.1002/1615-4169\(200209\)344:8<815::AID-ADSC815>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1615-4169(200209)344:8<815::AID-ADSC815>3.0.CO;2-H).

VARMA, Mahesh N.; MADRAS, Giridhar. Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical**

Technology & Biotechnology, vol. 83, no. 8, p. 1135–1144, 12 Aug. 2008.
<https://doi.org/10.1002/jctb.1897>.

WAHBA, Marwa I. Glutaraldehyde-copper gelled chitosan beads: Characterization and utilization as covalent immobilizers. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, vol. 50, p. 102668, Jul. 2023. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2023.102668>.

WANG, Dangfeng; CUI, Fangchao; XI, Liqing; TAN, Xiqian; LI, Jianrong; LI, Tingting. Preparation of a multifunctional non-stick tamarind polysaccharide-polyvinyl alcohol hydrogel immobilized with a quorum quenching enzyme for maintaining fish freshness. **Carbohydrate Polymers**, vol. 302, p. 120382, Feb. 2023a. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120382>.

WANG, Dangfeng; CUI, Fangchao; XI, Liqing; TAN, Xiqian; LI, Jianrong; LI, Tingting. Preparation of a multifunctional non-stick tamarind polysaccharide-polyvinyl alcohol hydrogel immobilized with a quorum quenching enzyme for maintaining fish freshness. **Carbohydrate Polymers**, vol. 302, p. 120382, Feb. 2023b. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120382>.

WANG, Jun; GU, Shuangshuang; PANG, Na; WANG, Fangqin; WU, Fuan. A study of esterification of caffeic acid with methanol using p-toluenesulfonic acid as a catalyst. **Journal of the Serbian Chemical Society**, vol. 78, no. 7, p. 1023–1034, 2013. <https://doi.org/10.2298/JSC120802101W>.

WANG, Shihui; MENG, Xianghe; ZHOU, Hua; LIU, Yang; SECUNDO, Francesco; LIU, Yun. Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review. **Catalysts**, vol. 6, no. 2, p. 32, 22 Feb. 2016. <https://doi.org/10.3390/catal6020032>.

WILTSCHI, Birgit; CERNAVA, Tomislav; DENNIG, Alexander; GALINDO CASAS, Meritxell; GEIER, Martina; GRUBER, Steffen; HABERBAUER, Marianne; HEIDINGER, Petra; HERRERO ACERO, Enrique; KRATZER, Regina; LULEY-GOEDL, Christiane; MÜLLER, Christina A.; PITZER, Julia; RIBITSCH, Doris; SAUER, Michael; SCHMÖLZER, Katharina; SCHNITZHOFFER, Wolfgang; SENSEN, Christoph W.; SOH, Jung; ... WRIESSNEGGER, Tamara. Enzymes revolutionize the

bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances**, vol. 40, p. 107520, May 2020. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2020.107520>.

WU, Shuke; SNAJDROVA, Radka; MOORE, Jeffrey C.; BALDENIUS, Kai; BORNSCHEUER, Uwe T. Biocatalysis: Enzymatic Synthesis for Industrial Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, vol. 60, no. 1, p. 88–119, 4 Jan. 2021. <https://doi.org/10.1002/anie.202006648>.

WU, Xiaoling; YANG, Cheng; GE, Jun. Green synthesis of enzyme/metal-organic framework composites with high stability in protein denaturing solvents. **Bioresources and Bioprocessing**, vol. 4, no. 1, p. 24, 19 Dec. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40643-017-0154-8>.

XU, Junpeng; WONG, Chui-Wei; HSU, Shan-hui. An Injectable, Electroconductive Hydrogel/Scaffold for Neural Repair and Motion Sensing. **Chemistry of Materials**, vol. 32, no. 24, p. 10407–10422, 22 Dec. 2020. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.0c02906>.

XU, Yameng; WU, Yaokang; LV, Xueqin; SUN, Guoyun; ZHANG, Hongzhi; CHEN, Taichi; DU, Guocheng; LI, Jianghua; LIU, Long. Design and construction of novel biocatalyst for bioprocessing: Recent advances and future outlook. **Bioresource Technology**, vol. 332, p. 125071, Jul. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2021.125071>.

XU, Yan; WANG, Dong; MU, Xiao Qing; ZHAO, Guang Ao; ZHANG, Ke Chang. Biosynthesis of ethyl esters of short-chain fatty acids using whole-cell lipase from *Rhizopus chinesis* CCTCC M201021 in non-aqueous phase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, vol. 18, no. 1–3, p. 29–37, Sep. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00056-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00056-5).

YADAV, Ganapati D.; DEVI, K.Manjula. Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl

butyrate: comparison and kinetic modeling. **Chemical Engineering Science**, vol. 59, no. 2, p. 373–383, Jan. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2003.09.034>.

YANG, Dayong. Recent Advances in Hydrogels. **Chemistry of Materials**, vol. 34, no. 5, p. 1987–1989, 8 Mar. 2022. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.2c00188>.

YANG, Xue; LI, Shuai; REN, Ya; QIANG, Lei; LIU, Yihao; WANG, Jinwu; DAI, Kerong. 3D printed hydrogel for articular cartilage regeneration. **Composites Part B: Engineering**, vol. 237, p. 109863, May 2022. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2022.109863>.

YAVARI MAROUFI, Leila; RASHIDI, Mohsen; TABIBIAZAR, Mahnaz; MOHAMMADI, Maryam; PEZESHKI, Akram; GHORBANI, Marjan. Recent Advances of Macromolecular Hydrogels for Enzyme Immobilization in the Food Products. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, 4 Jul. 2021. <https://doi.org/10.34172/apb.2022.043>.

ZAAK, Hadjer; PEIRCE, Sara; DE ALBUQUERQUE, Tiago; SASSI, Mohamed; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Exploiting the Versatility of Aminated Supports Activated with Glutaraldehyde to Immobilize β -galactosidase from *Aspergillus oryzae*. **Catalysts**, vol. 7, no. 9, p. 250, 25 Aug. 2017. <https://doi.org/10.3390/catal7090250>.

ZAINAL, Sarah Husnaini; MOHD, Nurul Hanisah; SUHAILI, Nabilah; ANUAR, Farah Hannan; LAZIM, Azwan Mat; OTHAMAN, Rizafizah. Preparation of cellulose-based hydrogel: a review. **Journal of Materials Research and Technology**, vol. 10, p. 935–952, Jan. 2021. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2020.12.012>.

ZHAN, Yeli; CHU, Chih-Chang. Biodegradation of hydrophilic–hydrophobic hydrogels and its effect on albumin release. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 13, no. 7, p. 667–676, 2002. <https://doi.org/10.1023/A:1015785625547>.

ZHANG, Dong-Hao; YUWEN, Li-Xia; PENG, Li-Juan. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. **Journal of Chemistry**, vol. 2013, p. 1–7, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/946248>.

ZHANG, Qiang. Multi-scale instrumented indentation of hydrogels. **The Mechanics of Hydrogels**. Elsevier, 2022. p. 91–118. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102862-9.00001-4>.