



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

KAIANY MOREIRA DOS SANTOS

**SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR ENZIMA Eversa®
TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

REDENÇÃO – CEARÁ

2023

KAIANY MOREIRA DOS SANTOS

SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR ENZIMA EVERSA®
TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

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

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria Cristiane Martins de Souza.

Co-Orientadora: Dr^a. Juliana de França Serpa.

REDENÇÃO – CEARÁ

2023

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

Santos, Kaiany Moreira Dos.

S237s

Síntese do Oleato de Etila catalisada por enzima eversa® transform 2.0 imobilizada em nanopartículas magnéticas / Kaiany Moreira Dos Santos. - Redenção, 2024.

60fl: il.

Dissertação - Curso de , Programa de Pós-graduação em Energia e Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2024.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Cristiane Martins de Souza.

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana de França Serpa.

1. Nanopartículas Magnéticas. 2. Imobilização. 3. Biodiesel.
I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 549.526

KAIANY MOREIRA DOS SANTOS

SÍNTESE DO OLEATO DE ETILA CATALISADA POR ENZIMA
EVERSA® TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADA EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS

Dissertação ao Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre. **Linha de Pesquisa:** Processos Sustentáveis inovação e difusão tecnológica. **Área de Pesquisa:** Processos Químicos.

Aprovado em: 12/12/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dra. Maria Cristiane Martins de Souza (Orientadora)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira –
UNILAB

Dra. Juliana de França Serpa (Co-orientadora)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira –
UNILAB

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira –
UNILAB

Dr. João Brandão Junior

Universidade da Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

*“O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão
o mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!”*

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus, que me sustentou até aqui e abençoou meus caminhos nesta jornada tão difícil.

Agradeço a minha família pelo apoio de sempre, minha mãe (in memória) que com certeza me daria todo apoio necessário para que eu pudesse alcançar minhas metas, ao meu pai que sempre me incentiva e demonstra estar orgulhoso do caminho que estou traçando, aos meus irmãos que eu amo pelo apoio de sempre e aos meus sobrinhos lindos que eu amo demais e que pra mim são como combustíveis para o cumprimento dessa jornada.

A minha tia Edileusa que na ausência da minha mãe sempre esteve por perto me acolhendo e me apoiando. Agradeço também a Cláudia, minha tia de coração e amiga que nunca me faltou e está sempre apta a me ajudar.

Aos meus amigos da graduação (Genius) que sempre incentivaram e me apoiaram para que eu pudesse dar mais esse passo na minha vida acadêmica, tenho orgulho de vocês e de toda nossa trajetória que mesmo na distância sempre nos apoiamos, nos incentivamos e nos acolhemos.

Agradeço também a família Castro nas pessoas de Elioneida Everton e Gabriella que são como uma segunda família pra mim, que desde muito tempo me adotaram como filha e estão sempre por perto me ajudando, incentivando e acolhendo com amor.

À minha orientadora Dr^a Maria Cristiane Martins de Souza por seus ensinamentos, que não mede esforços para ajudar, nos motiva e com seu alto astral sempre tem uma palavra positiva para nos mostrar que somos capazes.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite para avaliação da minha dissertação.

A Dr^a Juliana de França Serpa por toda ajuda no desenvolvimento desse trabalho e pela parceria, além de co-orientadora ganhei uma amiga incrível que tornou o percurso até aqui bem mais leve.

Aos amigos que a pós me deu, Viviane, Lennon, Marcelo pelas risadas diárias e por serem estarem dispostos a ouvirem minhas lamentações, reclamações e anseios, vocês são maravilhosos.

A Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo amparo à pesquisa e pela bolsa de mestrado concedida ao longo de desenvolvimento deste trabalho.

E a todos que de forma direta ou indiretamente ajudaram na conclusão desse trabalho desde os motoristas à todos que fazem parte da Unilab. MUITO OBRIGADA!

RESUMO

O presente trabalho avaliou nanopartículas magnéticas de ferro (NPMs) como suporte na imobilização por ligação covalente da lipase Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0) lançada em 2016 pela Novozymes com objetivo de ser utilizada na produção de biodiesel, comercializada na formulação líquida apresenta elevada atividade na transesterificação de glicerídeos e na esterificação de ácidos graxos livres. O biodiesel é composto por ésteres de ácidos graxos, sendo um potencial substituto para o combustível fóssil devido às características de renovabilidade, respeito ao meio ambiente e biodegradabilidade. Foi realizada aplicação da catálise na reação de esterificação para produção de oleato de etila a partir do ácido oleico e etanol. As nanopartículas magnéticas foram produzidas pelo método de co-precipitação e tiveram modificações realizadas em sua superfície com γ -aminopropiltriethoxissilano (APTES) e glutaraldeído. Condições operacionais foram avaliadas durante o processo de imobilização, como o efeito do pH (5, 6, 7, 8, 9 e 10), carga enzimática (50, 80, 100, 200, 250 e 300 U.g⁻¹), tempo de contato enzima-suporte (1, 2, 4, 6 e 8h) e reutilização do biocatalisador. Após o processo de imobilização a enzima mostrou ser mais eficiente que a enzima em sua forma livre. As melhores condições de imobilização para a ET 2.0 foram: pH 10 tampão carbonato de sódio 25mM, carga enzimática de 200 U.g⁻¹, tempo de contato 1h, obtendo-se um rendimento de 78% e atividade enzimática do derivado 205, 9 U.g⁻¹. O processo de cinética foi realizado sob as melhores condições de imobilização e avaliado no tempo de 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 e 96 h, sob agitação de 150 rpm a 37°C. Para o biocatalisador ET 2.0-NPM a conversão do ácido oleico em oleato de etila foi 88,1% após 16 horas. Realizou-se 14 ciclos consecutivos a partir do melhor tempo de conversão, até o 4º ciclo a conversão se manteve em torno de 80%, confirmando a produção de ésteres. A partir do 5º ciclo a conversão variou entre 77% e 39,9%.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Imobilização. Eversa® Transform 2.0. Biodiesel.

ABSTRACT

The present work evaluated magnetic iron nanoparticles (NPMs) as a support in the immobilization by covalent bonding of the lipase Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0), launched in 2016 by Novozymes with the aim of being used in the production of biodiesel, sold in a liquid formulation with high activity, in the transesterification of glycerides and in the esterification of free fatty acids. Biodiesel is composed of fatty acid esters and is a potential substitute for fossil fuel due to its renewability, environmental friendliness and biodegradability characteristics. Catalysis was applied to the esterification reaction to produce ethyl oleate from oleic acid and ethanol. The magnetic nanoparticles were produced by the co-precipitation method and had modifications carried out on their surface with γ -aminopropyltriethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde. Operating conditions were evaluated during the immobilization process, such as the effect of pH (5, 6, 7, 8, 9 and 10), enzymatic load (50, 80, 100, 200, 250 and 300 U.g⁻¹), enzyme-support contact (1, 2, 4, 6 and 8h) and reuse of the biocatalyst. After the immobilization process, the enzyme proved to be more efficient than the enzyme in its free form. The best immobilization conditions for ET 2.0 were: pH 10 25mM sodium carbonate buffer, enzymatic load of 200 U.g⁻¹, contact time 1h, obtaining a yield of 78% and enzymatic activity of the derivative 205.9 U.g⁻¹. The kinetic process was carried out under the best immobilization conditions and evaluated at 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 and 96 h, under agitation at 150 rpm at 37°C. For the ET 2.0-NPM biocatalyst, the conversion of oleic acid to ethyl oleate was 88.1% after 16 hours. 14 consecutive cycles were carried out starting from the best conversion time, until the 4th cycle the conversion remained at around 80%, confirming the production of esters. From the 5th cycle onwards, conversion varied between 77% and 39.9%.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Immobilization. Eversa® Transform 2.0. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Estrutura tridimensional da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> (código PDB:1DT3; 1GT6); sítio ativo (resíduos Ser146, His258, Asp201 em preto).....	22
FIGURA 2	Métodos de imobilização enzimática.....	24
FIGURA 3	Esquema do processo de imobilização enzimática.....	34
FIGURA 4	Caracterização magnética de materiais sintetizados e biocatalisadores: NPM - nanopartículas magnéticas (magnetita - Fe ₃ O ₄); Fe ₃ O ₄ /APTES - magnetita funcionalizada com APTES (g-aminopropiltriétoxissilano); Fe ₃ O ₄ /APTES_GLU - magnetita funcionalizada com APTES e ativada com GLU (glutaraldeído); Fe ₃ O ₄ /APTES_GLU_ET 2.0 - enzima EVERSA 2.0 imobilizada em magnetita funcionalizada em APTES e ativada com glutaraldeído.	40
FIGURA 5	Imagens VSM e FRX de: NPM - nanopartículas magnéticas (magnetita - Fe ₃ O ₄); Fe ₃ O ₄ /APTES - magnetita funcionalizada com APTES (g-aminopropiltriétoxissilano); Fe ₃ O ₄ /APTES_GLU - magnetita funcionalizada com APTES e ativada com GLU (glutaraldeído); Fe ₃ O ₄ /APTES_GLU_ET 2.0 - enzima EVERSA® TRANSFORM 2.0 imobilizada em magnetita funcionalizada em APTES e ativada com glutaraldeído.	41
FIGURA 6	Espectros de FTIR das amostras: nanopartículas magnéticas (magnetita - Fe ₃ O ₄); Fe ₃ O ₄ /APTES - magnetita funcionalizada com APTES (g-aminopropiltriétoxissilano); Fe ₃ O ₄ /APTES_GLU - magnetita funcionalizada com APTES e ativada com GLU (glutaraldeído); Fe ₃ O ₄ /APTES_GLU_ET 2.0 - enzima EVERSA® TRANSFORM 2.0 imobilizada em magnetita funcionalizada em APTES e ativada com glutaraldeído.	43

FIGURA 7 Efeito do pH nas atividades da Eversa® Transform 2.0 livres (●) e Eversa® Transform 2.0 imobilizada em nanopartícula magnética (■). Atividade determinada utilizando <i>p</i> -NPB (Carga enzimática: 80 U _p NPB.g ⁻¹).....	44
FIGURA 8 Efeito da carga enzimática (A _{t,d} , U.g ⁻¹) na imobilização de Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas.....	46
FIGURA 9 Efeito do tempo de contato (A _{t,d} , U.g ⁻¹) na imobilização de Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas.....	47
FIGURA 10 Síntese de oleato de etila utilizando ET 2.0-NPM imobilizada (■) e Eversa® Transform 2.0 livre (●) com carga enzimática 200 U.g ⁻¹ , a 37°C, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas em agitação de 150 rpm.....	48
FIGURA 11 Estabilidade operacional da síntese de oleato de etila utilizando ET 2.0-NPM carga enzimática 200 U.g ⁻¹ , a 37°C. Cada ciclo teve duração de 16 horas, sob agitação de 150 rpm.....	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil.....	30
TABELA 2 Parâmetros de imobilização de Fe ₃ O ₄ /APTES_ET 2.0 e Fe ₃ O ₄ /APTES_Glu_ET 2.0: Rendimento de imobilização (IY), atividade teórica (AtT), atividade real do derivado (AtD) e atividade recuperada (AtR).....	38

SUMÁRIO

1. Introdução	15
1.1 Objetivo geral	17
1.2 Objetivos específicos	17
2. Revisão bibliográfica	19
2.1 Enzimas	19
2.2 Lipase	20
2.3 Eversa Transform 2.0	22
2.4 Métodos de imobilização	23
2.4.1 Ligação covalente	24
2.4.2 Ligação cruzada	25
2.4.3 Aprisionamento	25
2.4.4 Encapsulação.	26
2.4.5 Adsorção.	26
2.5 Imobilização enzimática	27
2.6 Nanopartículas magnéticas	28
2.7 Biodiesel.	30
3. Metodologia	33
3.1 Materiais	33
3.2 Síntese da nanopartícula magnética (NPM)	33
3.3 Tratamento do suporte com g-aminopropiltriétoxisilano (APTES)	33
3.4 Ativação de suporte com glutaraldeído (GLU)	34
3.5 Imobilização	34
3.6 Medida da atividade enzimática	34
3.7 Determinação da atividade enzimática	35

3.8	Caracterização de suporte e biocatalisador	35
3.9	Estudo do pH na atividade do biocatalisador e da lipase solúvel	35
3.10	Efeito da carga enzimática	36
3.11	Efeito do tempo de contato	36
3.12	Síntese do oleato de etila	36
3.13	Estabilidade operacional de Eversa® Transform 2.0 imobilizada.....	36
3.13.1	Cinética.....	36
3.13.2	Síntese.....	37
4.	Resultados e discussões	38
4.1	Parâmetros de imobilização	38
4.2	Caracterização das nanopartículas magnéticas e biocatalisadores	39
4.2.1	Estudo do efeito da carga magnética nos suportes produzidos	39
4.2.2	Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Fluorescência de Raios-X (FRX) 40	
4.2.3	Análise FTIR.....	41
4.3	Estudo de pH na atividade do biocatalisador e da lipase.....	44
4.4	Efeito da carga enzimática.....	45
4.5	Efeito do tempo de contato.....	46
4.6	Esterificação catalítica.....	47
4.7	Estabilidade operacional.....	49
5.	Conclusão	52
6.	Referências	53

1. INTRODUÇÃO

O domínio e consequente dependência global dos combustíveis fósseis como fonte de energia vem gerando preocupações diante dos elevados índices de poluição ambiental e sua característica não renovável. A adição obrigatória do biodiesel ao diesel, no teor de 2% (B2) foi iniciada em janeiro de 2008, passou a 3% (B3) em julho de 2008 e foi aumentando com o passar dos anos, até que em março de 2022 passou a ser 10% (B10) e passará a 12% (B12) até março de 2024 (ANP 2023).

Fontes alternativas renováveis e promissoras de energia, como, por exemplo, o biodiesel, têm sido amplamente aplicadas e discutidas na busca de um futuro mais sustentável. (Duarte et al., 2022). Segundo o Balanço Energético Nacional (BEN) 2023 ano base 2022, o Brasil apresenta uma posição de destaque, pois possui um consumo energético de 47,4% proveniente de fontes renováveis. O consumo de biodiesel no país (m^3) diminuiu 6,5% o que pode ser explicado pela redução do percentual de mistura ao diesel para 10% ao longo de 2022. Como consequência destes movimentos, o setor de transportes do Brasil apresentou uma matriz energética composta por 22% de fontes renováveis em 2022, contra 23% do ano anterior. O percentual de mistura mandatório no diesel oriundo do petróleo manteve-se em 10% (em volume) ao longo do ano de 2022, se comparado ao ano anterior, o percentual da mistura foi de 13% em março, 12% em setembro, caindo para 10% em novembro.

O biodiesel é definido como ésteres monoalquílicos derivados de uma reação de transesterificação ou esterificação de óleos vegetais ou ácidos graxos de gorduras animais com um álcool primário. Industrialmente, o metanol é mais utilizado que o etanol devido ao seu menor custo e alta reatividade. Esse processo de síntese pode ocorrer com auxílio de catalisadores químicos ou enzimáticos (De Oliveira et al., 2020)

A indústria química está pouco a pouco se direcionando para processos mais ecológicos. Preocupados com o meio ambiente, nessa perspectiva, o emprego de catalisadores químicos é um dos principais obstáculos a serem contornados, uma vez que essas substâncias mediam a maioria das reações na indústria. Deste modo, busca-se catalisadores mais eficientes e produzidos a partir de fontes renováveis, como as enzimas, que são biocatalisadores altamente seletivos, tendo como resultado a redução de reações indesejáveis (Souza, 2013).

As enzimas são caracterizadas como macromoléculas biológicas que atuam como biocatalisadores bastante versáteis, em virtude das suas propriedades como quimio, regio

e estéreo especificidade (Sousa, 2022). Além disto, podem ser empregadas em diferentes processos e formas, (livres, ou seja, em sua forma solúvel ou também imobilizada). Em ambas as condições, os biocatalizadores possuem vantagens e desvantagens. Para a sua aplicação se deve levar em conta o tipo de processo, o modelo dos reatores, as características das matérias-primas e os produtos de interesse a serem formados (Remonato, 2017).

As lipases são denominadas triacilglicerolacil-hidrolases (EC 3.1.1.3), ou seja, pertencem à subclasse 1 das enzimas hidrolíticas de classe 3, sendo designadas como uma subclasse 1 devido à sua especificidade pelas ligações dos ésteres de ácidos carboxílicos. Constituem parte da família das hidrolases que catalisam ligações éster de ácidos carboxílicos. Tem como função natural hidrolisar triacilgliceróis em diacilglicerídeos, em monoglicerídeos, em ácidos graxos e em glicerol (Jakovetić Tanasković et al., 2017; Sousa et al., 2021)

A Eversa® Transform 2.0, foi introduzida em 2016 pela Novozymes, sendo uma lipase líquida derivada de *Thermomyces lanuginosus* geneticamente modificada e expressa em *Aspergillus oryzae*, com 269 resíduos de aminoácidos na sequência primária, apresentando baixo custo, alta especificidade para matérias-primas e alta atividade em condições amenas. Segundo o fabricante, a lipase é estabilizada por água, e sua formulação garante alta estabilidade e longa vida útil (Chang; Chan; Song, 2021; Fraga et al., 2019; Li et al., 2023; Monteiro et al., 2021).

A utilização de enzimas em sua forma livre evidencia alguns problemas relacionados à baixa estabilidade operacional, difícil recuperação e reutilização desses biocatalisadores. Entretanto, tais problemas podem ser superados quando técnicas de imobilização apropriadas são empregadas, já que, uma vez imobilizadas, as enzimas apresentam maior estabilidade, tornando as enzimas mais robustas e resistentes às reações em condições mais severas (Filho; Silva; Guidini, 2019).

A imobilização de enzimas em um suporte sólido provou ser uma maneira adequada de melhorar suas propriedades funcionais (Ashjari et al., 2020, Yousefi et al., 2020). A imobilização é dividida em 5 categorias principais: ligação covalente, adsorção, aprisionamento, encapsulamento e reticulação. A imobilização covalente é o método mais prevalente no qual as moléculas de enzima se ligam à superfície do suporte por meio de uma forte ligação covalente (Mohammadi et al., 2018).

Para que as reações ocorram, a superfície do suporte deve ser modificada ou funcionalizada e, nesse caso, o glutaraldeído é o reagente mais utilizado, atuando como ativador de suportes e/ou como braço espaçador, devido à simplicidade do seu uso e à alta estabilidade da ligação amino-glutaraldeído que é gerada (Ferreira Gonçalves et al., 2021).

Entre os suportes existentes, como os polímeros sintéticos, biopolímeros e sólidos inorgânicos, as nanopartículas magnéticas (NPMs) são de particular interesse na imobilização de enzimas devido à sua baixa toxicidade, grande área de superfície disponível, baixo custo e suas propriedades superparamagnéticas (Wan et al., 2022).

As nanopartículas magnéticas (NPMs) têm sido estudadas em vários campos de aplicações podendo ainda serem utilizadas para fornecer excelente suporte para vários catalisadores. As nanopartículas magnéticas têm o potencial de se tornarem eficientes suportes sólidos aos biocatalisadores devido sua fácil separação e recuperação do meio reacional por simples aplicação de campo magnético (Afzal et al., 2020). Assim, as NPMs podem ser usadas para imobilização de enzimas, uma vez que, após um ciclo de reação, eles podem ser recuperados e aplicados a um novo ciclo de reação.

Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi sintetizar e caracterizar o material magnético, a magnetita (Fe_3O_4) através de um método simples e eficiente, e avaliar sua aplicação como suporte para a imobilização da enzima Eversa® Transform 2.0. Também foram avaliadas as condições operacionais como: efeito do pH, carga enzimática, tempo de contato, caracterização do material magnético e estabilidade operacional, a fim de obtermos melhores condições para aplicação na síntese do oleato de etila.

1.1 Objetivo geral

Estudar a imobilização da lipase Eversa Transform® 2.0 (ET 2.0) em nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) e sua caracterização, com aplicação para produção de éster de oleato de etila (biodiesel).

1.2 Objetivos específicos

- Imobilizar a lipase ET 2.0 em nanopartículas magnéticas por ligação covalente;

- Realizar reações de esterificação do ácido oleico com etanol, na presença da enzima Eversa® Transform 2.0, nas formas livre e imobilizadas em nanopartículas magnéticas;
- Estudar as condições operacionais: pH, tempo de contato e carga enzimática;
- Sintetizar e caracterizar o material magnético (FTIR, MEV, VSM) e sua estabilidade operacional;
- Fazer um estudo do reuso do biocatalisador através de ciclos consecutivos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Enzimas

Enzimas são biocatalisadores extraídos a partir de células e conseguem aumentar a velocidade de reações químicas, reduzindo a energia necessária para a ativação. Devido à sua aplicabilidade em diversas áreas, despertam grande interesse de indústrias químicas, farmacêuticas e alimentícias (Hettiara Chchy et al., 2018; Ashkan et al., 2021, Denti, 2021).

As enzimas aceleram as reações químicas em ambos os sentidos de um processo reversível sem se alterar e estão envolvidas em todos os processos naturais. A partir da ação dessa classe especial de proteínas, as condições de reação se tornam energeticamente mais favoráveis, visto que, as enzimas atuam em condições de temperaturas abaixo de 100 °C, em valores de pH próximo a neutralidade e à pressão atmosférica (Aversa, 2022).

O entendimento da atuação desses biocatalisadores durante o processo de catálise foi estabelecido a partir do conceito de sítio ativo ou sítio catalítico, devido a sua especificidade em relação aos substratos que podem interagir. Este é definido como uma região tridimensional da enzima que permite a interação específica com o substrato e onde ocorre a reação química (Silva, 2012; Cavalcanti, 2020).

As enzimas são ativas em uma faixa estreita de pH e na maioria dos casos existe um pH ótimo, em que a sua atividade enzimática é máxima. Sua eficiência catalítica é influenciada pela ionização dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico e depende de uma conformação tridimensional específica dessa mesma região (Silva, 2017). É importante ressaltar que nem todas as enzimas possuem o mesmo pH ótimo. Cada sistema controla seu grau de ionização através de uma solução tamponante. A partir disso, é importante a nível laboratorial que se inclua em qualquer ensaio um tampão para estabilizar as variações de carga possibilitando estudar o comportamento dessas moléculas durante uma reação de catálise (Cavalcanti, 2020).

Os processos enzimáticos têm ganhado grande visibilidade na Indústria, pois têm ação rápida, são altamente específicos e podem economizar matéria prima, produtos químicos e energia quando comparados aos outros processos químicos. Atualmente, existem por volta de 5500 enzimas conhecidas, classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam (Farias, 2017).

As principais características de alta eficiência catalítica e alta especificidade garantem sua ampla utilização em processos industriais (Trindade Ximenes et al., 2021; ZHU; WU; HUA, 2019). Na indústria farmacêutica, as enzimas são alvos necessários de inibidores enzimáticos, visto que a atividade enzimática desregulada causada por problemas genéticos e a ativação de enzimas necessárias à replicação de microrganismos invasores são fundamentais para o entendimento de doenças e a consequente produção de medicamentos (Liu et al., 2013; Trindade Ximenes et al., 2021).

Uma aplicação crítica de enzimas é a biorremediação para problemas ambientais. Normalmente, fungos e bactérias podem produzir enzimas capazes de degradar poluentes tóxicos, convertendo-os em substâncias não tóxicas por meio de reações catalíticas (Saravanan et al., 2021b, 2021c). Como vantagens, a biorremediação com enzimas é de fácil operação, baixo custo, segura e ecologicamente correta (Rathi; Kumar, 2021; Saravanan et al., 2021a).

Muitas das aplicações em escala industrial de enzimas referem-se à modificação de óleos e gorduras para produzir ésteres etílicos aplicáveis nas indústrias de cosméticos, alimentos, química e combustível (Antonio; Amancio; Rosset, 2018; Cavalcante et al., 2020; Lima et al., 2021; Rocha et al., 2020).

2.2 Lipase

As lipases (triacilglicerol hidrolases EC 3.1.1.3) são as enzimas versáteis mais amplamente utilizadas na síntese orgânica, principalmente devido à sua seletividade, disponibilidade comercial, ampla especificidade e tolerância a solventes orgânicos, temperatura e pH extremos (Angajala *et al.*, 2016).

Em geral, as lipases são enzimas que catalisam reações de hidrólise de lipídios, transformando-os em glicerol e ácidos graxos, além de catalisar reações de acidólise, alcoólise, interesterificação e glicerólise, dependendo da quantidade de água no meio (Cavalcante *et al.*, 2020).

As principais fontes de obtenção de lipase são os microorganismos, podendo, também, ser produzidas por eucariotos superiores (plantas e animais) e procariotos (bactérias e actinomicetos). Dentre os fungos produtores de lipases destacam-se os gêneros *Rhizopus*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Humicola* e *Candida* (Ferreira, 2019).

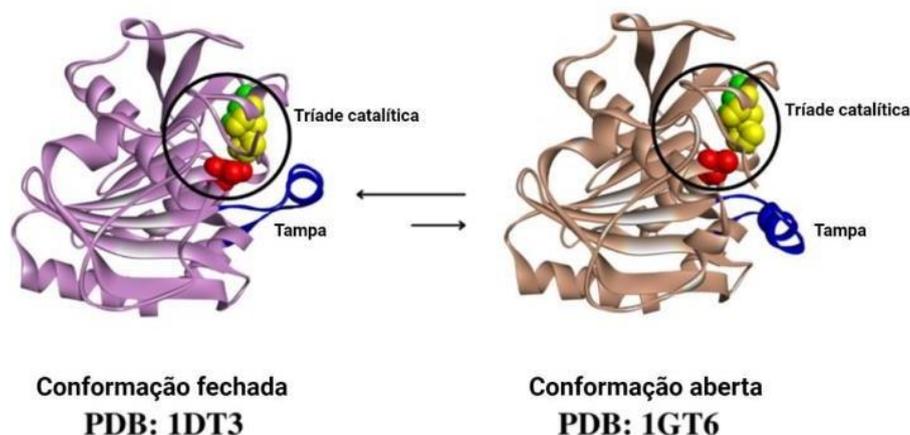
As lipases de origem microbiana são as mais utilizadas em processos industriais com mais de 200 lipases e aproximadamente 20 tipos produzidos em escala industrial (LI

et al., 2018). As lipases produzidas por microrganismos podem ser utilizadas extracelularmente, intracelularmente, líquidas, imobilizadas ou livres. Além disso, o uso deste tipo de lipases apresenta diversas vantagens, como alta versatilidade, disponibilidade e estabilidade. (Verma *et al.*, 2020).

As lipases, assim como outras enzimas, são inibidas por diversos componentes (temperatura, vários pH, etc.), sua estabilidade é moderada, além disso, são geralmente solúveis em água, essas propriedades, são um problema se vão ser usados como biocatalisadores industriais, onde espera-se que desempenhem sua função sob condições padronizadas (Ortiz *et al* 2018). Portanto, há uma necessidade urgente de desenvolver métodos eficazes para melhorar a estabilidade estrutural e a atividade biológica das enzimas em aplicações práticas (Chen *et al.*, 2020). A imobilização enzimática é uma técnica que permite o reaproveitamento do biocatalisador e geralmente melhora sua estabilidade, essas características são de fundamental importância para viabilizar a biocatálise industrial (Mulinari *et al.*, 2020).

As lipases têm duas conformações diferentes devido à presença de uma cadeia polipeptídica, uma “tampa”. Na sua forma fechada, o sítio ativo da enzima encontra-se isolado, desta maneira a lipase apresenta-se inativa. Entretanto, ao interagir com uma interface hidrofóbica (por exemplo, gotas de óleos, bolhas de ar, proteínas, suportes hidrofóbicos) ocorre a mudança da sua conformação para a forma ativa (tampa aberta) expondo seu sítio ativo (Brzozowski et al., 1991; Schrag et al., 1997; Miranda2020).

Figura 1 - Estrutura tridimensional da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (código PDB:1DT3; 1GT6); sítio ativo (resíduos Ser146, His258, Asp201 em preto).



Fonte: (SOUSA, 2022).

O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica que consiste dos aminoácidos SER – HIS – ASP como mostra a figura 1, sendo essa tríade frequentemente protegida por uma tampa helicoidal hidrofóbica (Vescovi, 2016). A interação da lipase com a interface lipídeo/água promove uma mudança conformacional na estrutura tridimensional da enzima movendo a tampa, convertendo a enzima de uma forma “fechada” para uma forma “aberta”, com o sítio ativo acessível ao substrato. Com a abertura da tampa, uma grande superfície hidrofóbica é exposta, facilitando a ligação da lipase ao substrato (Ferraz *et al.*, 2018).

Este mecanismo, conhecido como ativação interfacial, tem sido usado para desenvolver protocolos que permitem a imobilização, purificação, estabilização e hiperativação de lipases por meio da imobilização na sua forma aberta em suportes hidrofóbicos (Manoel *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2019).

2.3 Eversa Transform 2.0

As lipases são utilizadas para catalisar ligações éster por meio de reações de hidrólise com consumo simultâneo de moléculas de água. A enzima Eversa® Transform 2.0 é obtida como uma preparação comercial de lipase solúvel fornecida pela Novozymes® e é produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* com alta especificidade para matérias-primas, alta atividade em condições de processo suaves (Fraga *et al.*, 2019).

É uma enzima monomérica com 269 resíduos de aminoácidos, dos quais quatro são resíduos Trp (89, 117, 221 e 260). A massa molar desta lipase é de aproximadamente 30 kDa, mas uma pós-glicosilação tradicional em Asn 33 aumenta sua massa molar para cerca de 32 kDa (Pinholt et al., 2010). Remonato, (2017) encontrou uma massa molecular de 30 kDa para ambas formulações de Eversa. Fraga et al., (2019) determinaram a massa molar da NS-40116 correspondendo a 31,578 kDa.

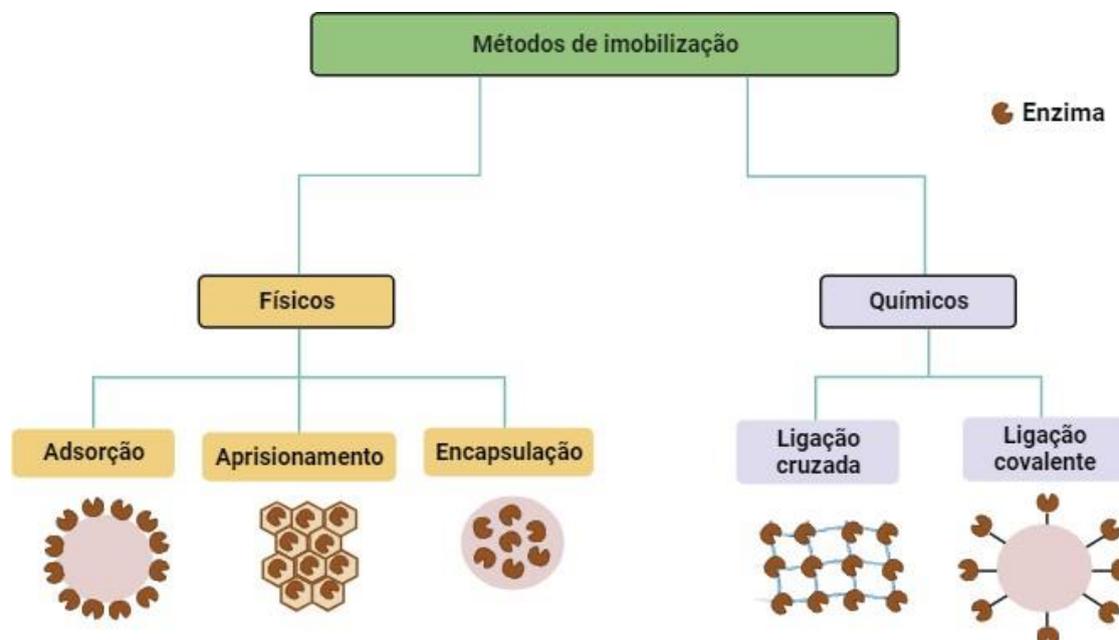
Segundo o fabricante a lipase é estabilizada por água, e sua formulação garante alta estabilidade e longa vida útil (pelo menos dois meses a <25 °C). Além disso, a enzima tem produtividade máxima a 40°C, mas torna-se instável em temperaturas acima de 45°C (Novozymes, 2016).

A Eversa® Transform 2.0 tornou-se comercialmente disponível apenas em 2016 e, até o momento, quase todos os trabalhos encontrados na literatura envolvem seu uso para a produção de biodiesel (Monteiro, 2021). Como a Eversa® Transform 2.0 é uma enzima geneticamente modificada para esse fim; sua resistência e estabilidade estão muito acima da média em termos de temperatura, solvente e pH (Bresolin, 2019). Assim, este biocatalisador pode apresentar desempenho interessante em outros sistemas, desde que seja adaptado para tal fim. Portanto, a possibilidade de imobilização da enzima em suportes hidrofóbicos permite a utilização da Eversa® Transform 2.0 para esterificação em sistemas anidros devido ao rearranjo em sua estrutura molecular, o que possibilita a estabilização de sua forma ativa (Fernandez-Lorente *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2019).

2.4 Métodos de imobilização

A imobilização de enzimas pode ser realizada por diferentes métodos, tais como: ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento, adsorção e ligação cruzada, conforme mostra a figura abaixo.

Figura 2. Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: Elaborado pelo autor.

2.4.1. Ligação covalente

Baseia-se na formação de ligações químicas covalentes, que são, normalmente, estabelecidas entre os grupos amino, grupos amino residuais, grupos sulfidríla e grupo hidroxila do anel fenólico dos aminoácidos constituintes da enzima com os grupos reativos do suporte (amino alquila, aminoarila, 3- glicidoxipropil-carboxila, etc.).

Os grupos funcionais dos suportes são gerados após a funcionalização empregando agentes químicos, como por exemplo, o glutaraldeído, que introduz um grupo carbonila, susceptível a reações com os grupos nucleofílico da enzima. Em geral, para que ocorra estas reações deve ser feita a modificação da superfície, ou funcionalização do suporte através da inserção de reagentes espaçadores que têm como finalidade deixar a enzima em maior contato com o meio reacional (Bezerra et al., 2015; Boudrant et al., 2020; Furlani et al., 2020).

De acordo com Furlani et al. (2020), a atividade da enzima imobilizada covalentemente irá depender do suporte utilizado, natureza do método de acoplamento,

composição do material e condições específicas durante a imobilização. Maiores atividades enzimáticas são obtidas quando os aminoácidos presentes no sítio ativo não estão envolvidos na interação com os suportes. Além disso, as enzimas imobilizadas covalentemente podem ser utilizadas em qualquer meio, devido a uma maior força de interação entre o suporte e a enzima quando comparado as enzimas imobilizadas por adsorção, que são mais susceptíveis as condições do meio, podendo apresentar perdas por dessorção.

2.4.2. Ligação cruzada

É uma técnica aplicável a uma ampla variedade de enzimas usando diferentes agentes reticulantes. A técnica de reticulação com formação de agregados enzimáticos reticulados (cross-linked enzyme aggregates – CLEA) é a mais utilizada e que apresenta melhores estabilidades operacionais em comparação aos demais métodos: reticulados de enzimas (cross-linked enzyme – CLE), cristais de enzima reticulados (cross-linked enzyme crystals – CLEC) e enzimas atomizadas reticuladas (cross-linked spray-dried enzyme – CSDE). É um método de imobilização irreversível, devido as forças envolvidas no processo, e não é necessária a utilização de suportes, uma vez que as enzimas se ligam aos agentes de reticulação (Mohamad et al., 2015; Yamaguchi et al., 2018).

Este método de imobilização se baseia em reações intermoleculares, ou seja, na formação de ligação covalente entre as enzimas e os reagentes bi- ou multifuncionais, com finalidade de torná-las insolúvel ao meio reacional. Uma vantagem desse método é a melhora na estabilidade da enzima durante a sua imobilização, possibilitando a sua reutilização. No entanto, esse método apresenta alguns inconvenientes, por ser uma técnica trabalhosa e lenta ela gera um alto custo, além de possuir baixa manutenção da atividade catalítica da enzima imobilizada (apresentando perdas de até 50% da atividade enzimática) durante o processo de reticulação, devido a possibilidade da formação de clusters (grandes aglomerados) ocasionando limitações difusionais do substrato até o sítio catalítico enzimático (Liu et al., 2018).

2.4.3 Aprisionamento

Imobilização por aprisionamento é definido como um método físico e irreversível de imobilização onde a enzima ficará confinada na estrutura do suporte. A imobilização de enzimas por confinamento envolve a polimerização *in situ* da matriz porosa em torno dos biocatalisadores a serem imobilizados, tendo as enzimas ocluídas em redes poliméricas de baixo custo de modo a evitar a agregação das mesmas. Este método para a imobilização de enzimas pelo processo sol-gel é promissor, visto que o mesmo ocorre

em meio aquoso e fornece condições ótimas de imobilização como pH, polaridade e afinidade, o que permite a manutenção da atividade catalíticas das enzimas confinadas na matriz, sem que essas sofram uma desnaturação significativa (Souza et al., 2017; Bilal & Iqbal, 2019; Furlani et al., 2020).

O método de imobilização por aprisionamento tem como vantagens a manutenção da conformação enzimática original, proteção do contato direto com o meio reacional minimizando a inativação da enzima por solventes orgânicos, além de poder ser utilizado para imobilizar uma ampla variedade de enzimas, visto que o mesmo não promove alterações na sua estrutura, já que não existe a formação de ligações covalentes entre as enzimas e a matriz do suporte (Liu et al., 2018; Furlani et al., 2020). As limitações deste método estão associadas especialmente aos problemas relacionados ao controle da porosidade do suporte, dificultando a transferência de massa do substrato para o sítio ativo da enzima, bem como perdas da enzima por dessorção através da matriz.

2.4.4 Encapsulação

A encapsulação evita a agressão e a desnaturação das proteínas no estado funcional sol-gel através do método químico (Pierre, 2004). Além disso, ocorre através de ligações covalentes ou não covalentes em géis ou fibras (Homaei et al., 2013). As principais vantagens do uso desta técnica são as características do suporte que proporcionam uniformidade, biocompatibilidade, estabilidade, condições suaves e alta pureza (Califano; Costantini, 2020).

O método por encapsulação consiste em proteger as enzimas em um único compartilhamento de volume definido, tendo a possibilidade de manter a enzima com uma certa mobilidade. Os meios poliméricos reticulados devem ter poros pequenos o suficiente para não permitir a passagem das enzimas, mas oferecendo passagem livre aos substratos e produtos. Isso permite que as enzimas permaneçam na solução, mas que fiquem protegidas de efeitos externos. Apesar da vantagem de não ocorrência de alteração estrutural da enzima, esse método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato da enzima for grande e não passar pelos poros do suporte (Carvalho, 2013).

2.4.5 Adsorção

Esta técnica é considerada mais direta e aplicada em condições suaves (RIOS et al., 2019a). Portanto, este método apresenta desvantagens para seu uso, como baixa estabilidade operacional, interações fracas entre enzima e suporte, e também a quantidade máxima de enzima absorvida durante a reação (Mohamad et al., 2015). Para melhorar

esta técnica, as cargas de superfície da proteína e do suporte precisam ser opostas para obter interações fortes (Coskun, 2016; Ozboyaci et al., 2016; Zhou; Pang, 2018). Este método é conduzido de maneira simples e passível de reversão, podendo ocorrer por meio de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. Por ser um método simples, o método de imobilização por adsorção é um dos mais empregado devido aos poucos efeitos na estrutura conformacional da enzima, uma vez que a enzima é espontaneamente imobilizada em uma orientação que lhe é preferencial e energeticamente favorável, além de apresentar baixo custo e ser de fácil execução (Torres et al., 2017).

Por ser um método espontâneo, este sofre o efeito da aleatoriedade da interação enzima-suporte e as forças envolvidas no processo de adsorção ocasionando assim uma desvantagem durante sua utilização. Essa aleatoriedade é ocasionada por diferentes parâmetros, como pH, temperatura, concentração salina, sendo responsáveis por influenciar na quantidade de enzima adsorvida e a força das interações. Além disso, as alterações destes parâmetros podem levar a dessorção das enzimas imobilizadas. Desta forma, a eficiência deste método irá depender das condições do meio bem como da relação entre a concentração da enzima e do suporte (Souza et al., 2017).

2.5. Imobilização enzimática

A imobilização enzimática é uma técnica que minimiza problemas relacionados como custo e estabilidade da enzima. A enzima imobilizada permite uma fácil separação do meio reacional, viabilizando assim, o seu reaproveitamento. Muitas vezes, a imobilização enzimática é capaz de melhorar a atividade da enzima e também pode melhorar a seletividade das proteínas e minimizar os efeitos de inibição, distorcendo ou bloqueando o centro ativo das enzimas e reduzindo a inibição por algum substrato, componente do meio bruto ou produto de reação (Silva et al., 2017).

Para cada tipo de aplicação, a escolha do material imobilizado requer a análise de uma série de fatores como: a utilização da atividade catalítica por um período maior de tempo, facilidade de separação do produto, facilidade na recuperação do biocatalisador, influência da temperatura e do pH, entre outros. Isso se deve as diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos (Cavalcanti, 2020).

Para as lipases, devido ao fenômeno de adsorção interfacial, um dos métodos mais vantajoso para sua imobilização é a adsorção em suportes hidrofóbicos. Neste processo a atividade das lipases aumentam, uma vez que a enzima é imobilizada com a tampa aberta,

facilitando o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, independentemente do meio onde a enzima se encontra (Fernandez-Lafuente et al., 1998; Fernandez- Lorente et al., 2008). No entanto, as interações com o suporte são relativamente fracas e a enzima pode lixiviar devido a mudanças no pH, força iônica, temperatura ou polaridade do solvente, portanto, o catalisador deve ser usado em condições muito específicas (Osbon; Kumar, 2020).

Imobilizações por ligações covalentes promovem uma ligação estável entre a enzima e o suporte, evitando a lixiviação das enzimas para o meio reacional (Sheldon; Van Pelt, 2013). A ligação covalente enzima-suporte pode ser uni ou multipontual por meio de aminoácidos de cadeias laterais, como um grupo ϵ -amino (lisina), tiol (cisteína) e carboxílico (ácidos aspártico e glutâmico) (Brena; González-Pombo; Batista-Viera, 2013) promovendo a estabilização da estrutura terciária da enzima imobilizada e consequentemente, aumentando a estabilidade da atividade catalítica frente a altas temperaturas, pH extremos e na presença de solventes (Guisan, 2006; Miranda, 2020).

As nanopartículas magnéticas têm chamado a atenção como suporte para imobilização de lipases (Bilal et al., 2018). O suporte mais utilizado é a magnetita (Fe_3O_4), que geralmente é ativada com algum agente químico, e a imobilização se dá por ligação covalente. A principal vantagem do uso de nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de enzimas é a facilidade de recuperação do biocatalisador do meio reacional, além disso destacam-se características, como a grande área superficial, mobilidade e alta transferência de massa (Bilal et al., 2018).

2.6. Nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas (NPMs) são compostos formados por átomos ou moléculas que apresentam resposta a um campo magnético e possuem um tamanho bastante reduzido, entre 1 a 100 nm. Sua composição pode ser originada por diferentes elementos magnéticos como o ferro, cobalto, manganês, cobre e seus respectivos óxidos, além de outros metais de transição. Sendo uma de suas grandes vantagens a facilidade de manipulação por meio de um campo magnético externo (Ferreira, 2019).

Na natureza existem diversos tipos de óxidos de ferro, sendo os principais: a ferrihidrita (Fe_5HO_8); a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$); e a magnetita (Fe_3O_4). Essas espécies possuem propriedades magnéticas, elétricas, morfológicas e físico-químicas interessantes para a aplicação tecnológica (Aversa, 2022).

As NPMs apresentam grande área superficial, logo, possuem alta energia superficial, e são consideradas superparamagnéticas, dependendo do acoplamento magnético entre os centros metálicos. As interações dipolo magnético e dipolo-campo magnético podem gerar aglomerados em escala micro, diminuindo sua área superficial. Com o revestimento adequado, as NPMS não sofrem aglomeração e podem ser dispersas em diferentes soluções, o que permite sua aplicação sem a formação de agregados (Mohammed et al., 2017).

As NPMs têm despertado interesse nos ramos da física, química, medicina, materiais e meio ambiente, devido às suas múltiplas aplicações e reações catalíticas. Estas aplicações dependem das modificações em sua superfície com compostos que contenham grupos funcionais capazes de interagir com os analitos, fármacos, toxinas ou poluentes (Ferreira, 2019).

Entre as aplicações descritas até o momento, podemos destacar a produção de biossensores magnéticos, diagnósticos médicos, catálise, bioprocessos e remediação ambiental (remoção de metais tóxicos dos meios aquosos). Suas aplicações dependem muitas vezes do uso de campos magnéticos que manipulam suas propriedades, decorrente da efetividade do momento magnético das partículas e do gradiente do campo (Silva, 2017).

Suportes magnéticos foram aplicados para imobilizar enzimas pela primeira vez em 1973 e atualmente têm sido amplamente utilizados para este fim. Enzimas imobilizadas em suportes magnéticos podem ser mais facilmente recuperadas de um meio reacional através da aplicação de um campo magnético externo. Além da redução dos custos operacionais, sendo reutilizadas em variados processos sem perder sua capacidade magnética (Ferreira, 2019).

As vantagens do uso de nanopartículas magnéticas como suporte para a imobilização são: facilidade de extração do meio reacional, fácil obtenção, dependendo do método utilizado na síntese, possível funcionalização da superfície, resistência a altas temperaturas, estabilidade da enzima e reutilização. A nanopartícula mais utilizada para fins de imobilização é a magnetita (Fe_3O_4), que apresenta uma estrutura cristalina, formada por um spinel invertido, onde Fe^{3+} ocupam espaços tetraédricos e centros de ferro (II/III) alternados em centros octaédricos (Cavalcanti, 2020).

Nanopartículas podem ser produzidas por diversas metodologias tais como co-precipitação, decomposição térmica, microemulsão, pirólise e liga mecânica. Contudo, pode-se destacar o método de co-precipitação que é uma técnica fácil e conveniente de

produzir óxidos de ferro (Fe_3O_4 ou $\text{c-Fe}_2\text{O}_3$) a partir de soluções aquosas de sal $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ pela adição de uma base sob atmosfera inerte à temperatura ambiente ou a temperatura elevada. (Abu-Dief & Abdelfatah, 2017).

O formato, a dimensão e a composição das nanopartículas magnéticas têm como variáveis o tipo dos sais empregados, a proporção $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$, a temperatura de reação, o pH da solução, a força iônica do meio e a taxa de mistura com a solução da base. (Abu-Dief & Abdelfatah, 2017).

2.7. Biodiesel

O Biodiesel pode ser definido, de acordo com a ANP (2023), como um combustível renovável obtido a partir de um processo químico denominado transesterificação. Por meio desse processo, os triglicerídeos presentes nos óleos e gordura animal reagem com um álcool primário, metanol ou etanol, gerando dois produtos: o éster e a glicerina. O primeiro somente pode ser comercializado como biodiesel, após passar por processos de purificação para adequação à especificação da qualidade, sendo destinado principalmente à aplicação em motores de ignição por compressão (ciclo Diesel).

A sua mistura ao diesel fóssil teve início em 2004, em caráter experimental e, entre 2005 e 2007, no teor de 2%, a comercialização passou a ser voluntária. A obrigatoriedade veio no artigo 2º da Lei nº 11.097/2005, que introduziu o biodiesel na matriz energética brasileira. Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória de 2% (B2), em todo o território nacional. Com o amadurecimento do mercado brasileiro, esse percentual foi sucessivamente ampliado pelo CNPE até o atual percentual de 12,0% (ANP, 2023).

Tabela 1: Evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil.

Mês/ano	Percentual (%)
Jan/2005 a Dez/2007	2% (facultativo)
Jan/2008 a Jun/2008	2%
Jul/2008 a Jun/2009	3%
Jul/2009 a Dez/2009	4%
Janeiro/2010 a Jun/2014	5%
Julho/2014 a Out/2014	6%

Nov/2014 a Fev/2017	7%
Mar/2017 a Fev/2018	8%
Mar/2018 a Ago/2019	10%
Set/2019 a Fev/2020	11%
Mar/2020 a Ago/2020	12%
Set/2020 a Out/2020	10%
Nov/2020 a Dez/2020	11%
Jan/2021 a Fev/2021	12%
Mar/2021 a Abr/2021	13%
Mai/2021 a Ago/2021	10%
Set/2021 a Out/2021	12%
Nov/2021 a Mar/2023	10%
Abr/2023 a Mar/2024	12%
Abr/2024 a Mar/2025	13%
Abr/2025 a Mar/2026	14%
Abr/2026	15%

Fonte: ANP (2023).

Quando o objetivo é a produção de biodiesel ou de óleos lubrificantes a reação de transesterificação alcalina de triglicerídeos (ésteres do glicerol) é a mais comum, porém, ela é inviável quando o teor de ácidos graxos livres é muito alto, pois ocasiona a formação de sabões, reduzindo o rendimento da reação e dificultando o processo de extração do éster (Lucema, I. L.; et al, 2011).

Já a esterificação, é um processo de formação de ésteres a partir de ácidos graxos e álcool. A reação de esterificação ocorre na presença de um catalisador e calor, o íon hidroxil (-OH) do ácido carboxílico é removido e, após isso, o hidrogênio do álcool é removido. A hidroxila e o hidrogênio se combinam para formar água como subproduto da reação e éster como produto principal. Essa reação apresenta um equilíbrio químico, que dependendo das condições reacionais empregadas, pode favorecer a reação de esterificação entre o ácido graxo livre e o álcool, ou o sentido inverso da reação em que se tem a hidrólise do éster. (Rade, L. L.; et al, 2018).

Dentre os biocombustíveis, o biodiesel é o que mais vem se destacando como substituto ao óleo diesel utilizado no setor de transportes (Hosseinzadeh-

Bandbafha *et al.*, 2018). Além disso, ele vem se mostrando um dos biocombustíveis mais promissores, apresentando benefícios como biodegradabilidade, sustentabilidade e baixa emissão de poluentes e GEE (Syafiuddin *et al.*, 2020).

Industrialmente, a rota mais comum para produção do biodiesel é a química utilizando como álcool primário o metanol, por ser comercializado com alto grau de pureza, não ser higroscópico e por proporcionar um melhor processo de separação de fases entre biodiesel e glicerina. No entanto, esse álcool é de fonte fóssil e altamente tóxico. A substituição do metanol por etanol na transesterificação dos óleos vegetais e gorduras animais para produção de biodiesel tem sido muito empregada, pois todos os reagentes e produtos são considerados renováveis e não tóxicos (Marchetti, 2010).

O uso de catalisadores enzimáticos é uma alternativa que viabiliza a utilização de óleos ou gorduras não refinadas ou residuais com diferentes teores de AGLs, devido à elevada seletividade das enzimas, dispensando etapas de pré-tratamento, lavagem e purificação para obtenção do biodiesel, assim como não promovendo a geração de reações indesejáveis (Athar; Zaidi, 2020; Cesarini *et al.*, 2015).

A produção de biodiesel a partir da rota enzimática permite contornar os problemas enfrentados quando catalisadores convencionais são empregados. As reações são catalisadas pelas lipases e ocorrem em condições brandas de reação, permitem a utilização de insumos de baixo custo que contêm água e AGLs, por exemplo, óleos não comestíveis e óleos usados, evitando reações indesejadas e apresenta um elevado grau de pureza dos produtos (Aransiola *et al.*, 2014; Lotti *et al.*, 2018).

Os ésteres de ácidos graxo são de grande interesse industrial, pois são encontrados em diversos produtos como aromas, perfumes, cosméticos, medicamentos e também na produção de biocombustíveis. A síntese de ésteres apresenta muitas características e impactos ambientais durante a produção e processos de purificação, devido a utilização de produtos químicos perigosos solventes tóxicos e de alta temperatura e pressão (Souza, 2013; Sá *et al.*, 2017).

Os ésteres metílicos e etílicos, os ácidos graxos de cadeia longa como os ácidos graxos, palmitatos, ricinoleatos e linolenatos são os compostos principais biodiesel. O biodiesel apresenta diversas vantagens sobre os métodos atualmente utilizados, pois é um biocombustível renovável, não-inflamável, biodegradável e não tóxico. (Khoobakht *et al.*, 2016). O biodiesel pode ser produzido a partir da esterificação de ácidos graxos da cadeia curta e álcoois, geralmente metanol e etanol por possuírem valor mais baixo (Farias, 2017).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Materiais

A lipase Eversa® Transform 2.0 foi adquirida da Novozyme Lantin America Ltda (Araucária, Brasil). O g-aminopropiltriétoxissilano (APTES), solução de glutaraldeído grau II 25% (m/v), butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) e *p*-nitrofenila (*p*NP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes de grau analítico foram obtidos da Distribuidora Cequímica (Fortaleza, Brasil).

3.2. Síntese das Nanopartículas Magnéticas (NPM)

As Nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) foram produzidas pelo método de co-precipitação (Barreto et al., 2012), com adaptações. Foram pesados 1,55g de sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 3,0g de cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$). Ambos foram diluídos em água e misturados num becker. A solução foi ajustada para pH 3 usando HCl a 5% (v/v) e aquecida a 80 °C sob agitação de 1.200 rpm durante 30 min. Posteriormente, foram adicionados, por gotejamento, 30 mL de NH_4OH PA e deixado a mistura em aquecimento e agitação de 1.200 rpm por 30 min, sendo formado um precipitado preto, conforme reação abaixo:



O precipitado foi lavado várias vezes com água destilada até a solução residual atingir a neutralidade. Após a lavagem realizou-se uma única lavagem com etanol para remoção da água residual e separado do sobrenadante com auxílio de um campo magnético. Finalmente, a magnetita sintetizada foi levada ao dessecador para secar completamente. O suporte foi denominado NPMs.

3.3. Tratamento do suporte com g-aminopropiltriétoxissilano (APTES)

A reação foi iniciada com a adição das nanopartículas magnéticas em 200 ml de etanol (95%). A seguir, o material foi levado a ultrassom durante 1 h. Após esse período, adicionou-se 10 ml de APTES e deixado em ultrassom por mais 1 h a 60°C. O material precipitado foi lavado com etanol com o auxílio de um ímã e, em seguida, levado para dessecador (Netto; Andrade; Toma, 2009), com adaptações.

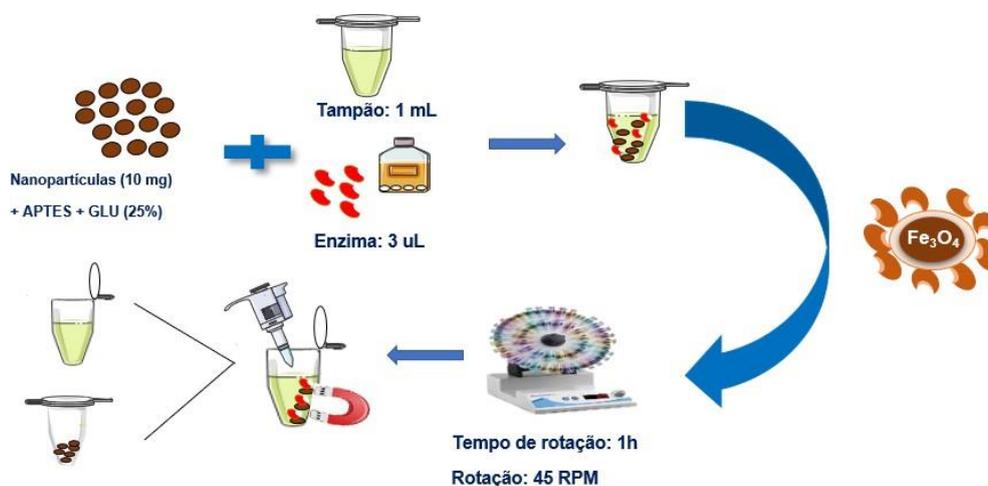
3.4. Ativação do suporte com glutaraldeído (GLU)

As nanopartículas magnéticas (NPMs) foram suspensas em uma solução de glutaraldeído (GLU) a 25% (p/v), conforme metodologia descrita por Souza et al. (2017). Inicialmente, 25 μL de glutaraldeído foram colocados em contato direto com 0,01g de partículas de magnetita. A reação foi mantida sob agitação por 2 h a 25°C. Em seguida, os suportes foram lavados três vezes com tampão fosfato de sódio 5 mmol.L^{-1} (pH 7) para a remoção do excesso de glutaraldeído. O suporte foi denominado NPM-GLU (Souza, 2013).

3.5. Imobilização

Pesou-se 0,01 g de nanopartículas magnéticas (NPMs) e adicionou-se 1 mL de solução tampão de fosfato de sódio, 5 mmol.L^{-1} , pH 7,0, 25 °C e foi colocado sob agitação contínua de 45 rpm, por 1 h. A enzima imobilizada foi removida da solução por separação magnética, assim como mostra o esquema abaixo.

Figura 3: Esquema do processo de imobilização enzimática.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6. Medida da atividade enzimática

A atividade hidrolítica da Eversa® Transform 2.0 solúvel e imobilizada (derivado) (Atd) foi determinada usando butirato de p-nitrofenol (pNPB) como substrato, a pH 7,0 e 25°C, seguindo a metodologia proposta por Kordel et al. (1991), com adaptações.

3.7. Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima ($80 \text{ U}_{p\text{NPB}} \cdot \text{g}^{-1}$) foi determinada espectrofotometricamente usando $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de butirato de *p*-nitrofenil (*p*-NPB) em álcool isopropílico. A mistura de reação foi preparada misturando $50 \mu\text{L}$ de *p*-NPB em $2,5 \text{ mL}$ de tampão fosfato de sódio $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 7, e $50 \mu\text{L}$ da amostra ou 10 mg de biocatalisador a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. O produto liberado durante a hidrólise de *p*-NPB, *p*-nitrofenol, foi quantificado por espectrometria usando um espectrofotômetro JASCO V-730 BIO em um comprimento de onda de 348 nm ($\epsilon = 10,052 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa $1 \mu\text{mol}$ de substrato (*p*-NPB) por minuto, de acordo com às condições citadas acima (Souza et al., 2017).

3.8. Caracterização de suporte e biocatalisador

Os suportes e biocatalisadores foram caracterizados por análise de magnetômetro de amostra vibratória (VSM), microscopia eletrônica de varredura (MEV) com espectroscopia FRX e espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).

As curvas magnéticas foram obtidas utilizando um magnetômetro de amostra vibratória (VSM) a 300 K . Para garantir os valores dos momentos magnéticos adquiridos. O VSM foi previamente calibrado utilizando material de referência padrão. Para todas as medições, o momento magnético obtido para cada campo aplicado foi normalizado pela massa das nanopartículas.

Imagens VSM e espectroscopia FRX foram realizadas para avaliar a morfologia e a composição química. VSM foi realizado no microscópio QUANTA 450 FEG. As amostras foram fixadas em fita de carbono e metalizadas com prata utilizando o equipamento de metalização QUORUM QT150ES. Um feixe de elétrons com 20 kV foi aplicado. O FRX foi realizado utilizando um equipamento SHIMADZU modelo EDX-7000 equipado com tubo de ródio, aplicando uma potência de 4 kV nas amostras de pó.

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em espectrofotômetro PERKIN-ELMER 2000 com faixa de número de onda entre 4000 e 400 cm^{-1} . As amostras foram previamente secas para remover a absorção de água e dispersas em KBr na proporção de 1:10. Posteriormente, foram moldados em pastilhas translúcidas com o auxílio de uma prensa hidráulica.

3.9. Estudo do pH na atividade do biocatalisador e da lipase solúvel

O efeito do pH na atividade do biocatalisador e da enzima solúvel foi determinado em diferentes valores de pH utilizando *p*-NPB, de acordo com o descrito anteriormente em 3.7, em diferentes tampões a 25mM: acetato de sódio em pH 5,0, fosfato de sódio em valores de pH 6,0 a 8,0 e carbonato de sódio em pH 9,0 e 10 (Miranda et al., 2020).

3.10. Efeito da Carga Enzimática

O efeito da carga enzimática foi conduzido de 50 U.g⁻¹ a 300 U.g⁻¹ de carga enzimática. Para o estudo foi realizada a imobilização em triplicata através do contato de 0,01g de nanopartículas magnéticas a 1mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e adição da enzima Eversa® Transform 2.0, cuja quantidade foi alterada conforme a carga estudada. Após a imobilização foi feita a leitura como descrito anteriormente em 3.7 a fim de se verificar a atividade do derivado (Souza et al., 2017).

3.11. Efeito do tempo de contato

O efeito do tempo de contato foi avaliado nos tempos de 1, 2, 5 e 8 horas, a imobilização foi realizada nas mesmas condições citadas anteriormente através do contato de 0,01g de nanopartículas magnéticas a 1mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 e adição de 200 U.g⁻¹ da enzima Eversa® Transform 2.0. Ao final de cada tempo foi realizada a leitura do derivado.

3.12. Síntese do oleato de etila

Os experimentos de esterificação foram executados em micro tubos de plástico (2,0 mL) contendo 0,6g de ácido oleico PA, 151µL de etanol (razão molar 1:1) e 0,01g do biocatalisador ET 2.0-NPM. A reação foi conduzida em agitação orbital a 150 rpm, a 37°C. O índice de acidez foi analisado pelo método 5-40 AOCS com adaptações (Mossoba; Kramer, 2010; Souza 2013).

3.13. Estabilidade operacional de Eversa® Transform 2.0 imobilizada

3.13.1 Cinética

A cinética foi realizada no tempo de 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 e 96 horas, a fim de se verificar o tempo de melhor conversão para enzima livre e imobilizada. Foram colocados em microtubos de plástico 0,01g de nanopartículas magnéticas, 8 µL da enzima, 0,6g de ácido oléico e 151 µL de etanol, o mesmo processo foi realizado para enzima livre com ausência do suporte. A mistura reacional foi agitada a 150 rpm nos

tempos estipulados. Em seguida, foi pesado 0,5g do produto reacional (ésteres) em um erlenmayer, acrescentou-se 25mL de álcool comercial neutralizado, 2 gotas de fenolftaleína e titulado com KOH 0,1M. O volume gasto de KOH foi anotado para realização do cálculo da conversão do ácido oleico em oleato de etila (Souza 2013).

3.13.2 Síntese

A estabilidade operacional por reação de esterificação foi realizada como descrito na seção 3.13.1, através da síntese consecutiva do oleato de etila, a partir do melhor tempo de conversão encontrado. Antes de cada ciclo, o derivado foi separado por magnetização e lavado com hexano para remoção de produtos e substrato não reagido (Souza, 2013).

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram avaliados em 1 hora de imobilização, utilizando uma carga enzimática de 200 U.g⁻¹. As soluções enzimáticas foram preparadas nas mesmas condições, exceto pela ausência do agente ativador em uma das amostras. O suporte não ativado com glutaraldeído apresentou um rendimento de imobilização de 82% e atividade do derivado 101,25 Ug⁻¹ em contrapartida o suporte ativado com glutaraldeído obteve um rendimento de imobilização de 90,5% e a uma atividade de 196,1 Ug⁻¹, os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 2. Mesmo os parâmetros avaliados resultando em valores próximos, pode-se observar que o suporte ativado com glutaraldeído apresentou melhores resultados, demonstrando que o glutaraldeído desempenha um papel significativo na imobilização da enzima, viabilizando a ela melhor estabilização, redução da lixiviação e possibilita uma maior reutilização.

Tabela 2: Parâmetros de imobilização de Fe₃O₄/APTES_ET 2.0 e Fe₃O₄/APTES_Glu_ET 2.0: Rendimento de imobilização (IY), atividade teórica (AtT), atividade real do derivado (AtD) e atividade recuperada (AtR).

Biocatalisador	Rendimento (%)	Atividade teórica (U.g ⁻¹)	Atividade do derivado (U.g ⁻¹)	Atividade recuperada (U.g ⁻¹)
Fe ₃ O ₄ /APTES_ET 2.0	82 ± 1,3	163.3 ± 1,5	101.25 ± 1,2	69 ± 0,1
Fe ₃ O ₄ /APTES_Glu_ET 2.0	90,5 ± 1,1	183,5 ± 0,5	196.1 ± 0,2	99 ± 0,01

Fonte: Elaborada pelo próprio autor.

Na literatura pode-se encontrar alguns trabalhos que relatam a eficiência do glutaraldeído quanto agente ativador no processo de imobilização enzimática. Quando é usado como reticulador, estratégias de imobilização podem ser empregadas (Migneault et al., 2004; De Oliveira et al., 2018). Uma possibilidade é imobilizar a enzima em um suporte ativado por glutaraldeído. Nesse procedimento, são observadas as condições em que ocorreu modificação do grupo amina especificamente com uma ou

duas moléculas de glutaraldeído (Fernandez-Lafuente et al., 1995; De Oliveira et al., 2018).

Osuna et al., 2015, em seus estudos com amostras tratadas com glutaraldeído obtiveram quase 90% de rendimento de imobilização. Monteiro et al., 2019, avaliaram a imobilização da lipase com e sem o uso do suporte e constatou que para a imobilização covalente seu rendimento de imobilização foi de cerca de 84%, sendo o dobro do rendimento obtido na imobilização sem ativação do glutaraldeído, concluindo que a enzima imobilizada em nanopartículas ativadas por glutaraldeído mostrou resultados mais satisfatório do que as nanopartículas não ativadas com glutaraldeído.

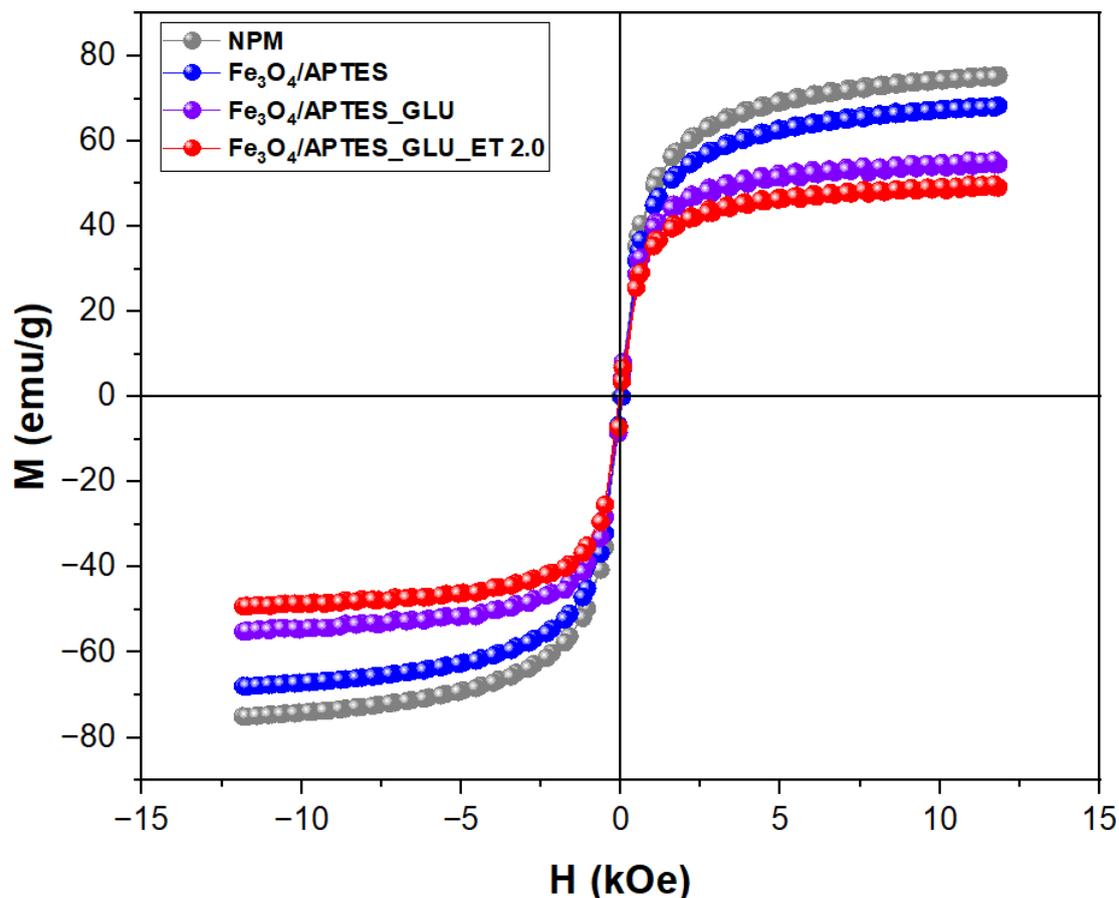
Ranjbari et al., 2019, mostraram em seus estudos que um suporte sem ativação de glutaraldeído imobilizou apenas uma pequena porcentagem da atividade enzimática (abaixo de 10%), enquanto um ótimo de atividade imobilizada foi encontrado usando 1% de glutaraldeído, onde 100% da enzima foi imobilizada.

4.2. Caracterização das nanopartículas magnéticas e biocatalisadores

4.2.1. Estudo do efeito da carga magnética nos suportes produzidos

As amostras de NPMs, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU_ET 2.0}$ apresentaram magnetizações de, aproximadamente, 70, 55 e 50 emu/g, respectivamente. Os valores de magnetização de saturação (Ms) diminuíram com a ativação das NPM com APTES e com glutaraldeído. Esse mesmo comportamento foi obtido quando nanopartículas magnéticas (NPMs) foram recobertas com APTES e glutaraldeído no estudo feito por Costa et al, (2016). A magnetização de saturação (Ms) também diminuiu com a imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0. Sendo assim, a diminuição nos valores de Ms pode aparentemente ser explicada devido à introdução de espécies não magnéticas. Porém, o nanossistema produzido ainda pode ser rapidamente separado por um campo magnético Freire et al, (2016) e o sistema magnético mostrou que a funcionalização das nanopartículas magnéticas (NPMs) foi bem-sucedida como suporte para o biocatalisador.

Figura 4: Caracterização magnética de materiais sintetizados e biocatalisadores: NPM - nanopartículas magnéticas (magnetita - Fe_3O_4); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ - magnetita funcionalizada com APTES (g-aminopropiltriétoxissilano); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU}$ - magnetita funcionalizada com APTES e ativada com GLU (glutaraldeído); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU_ET 2.0}$ - enzima Eversa 2.0 imobilizada em magnetita funcionalizada em APTES e ativada com glutaraldeído.

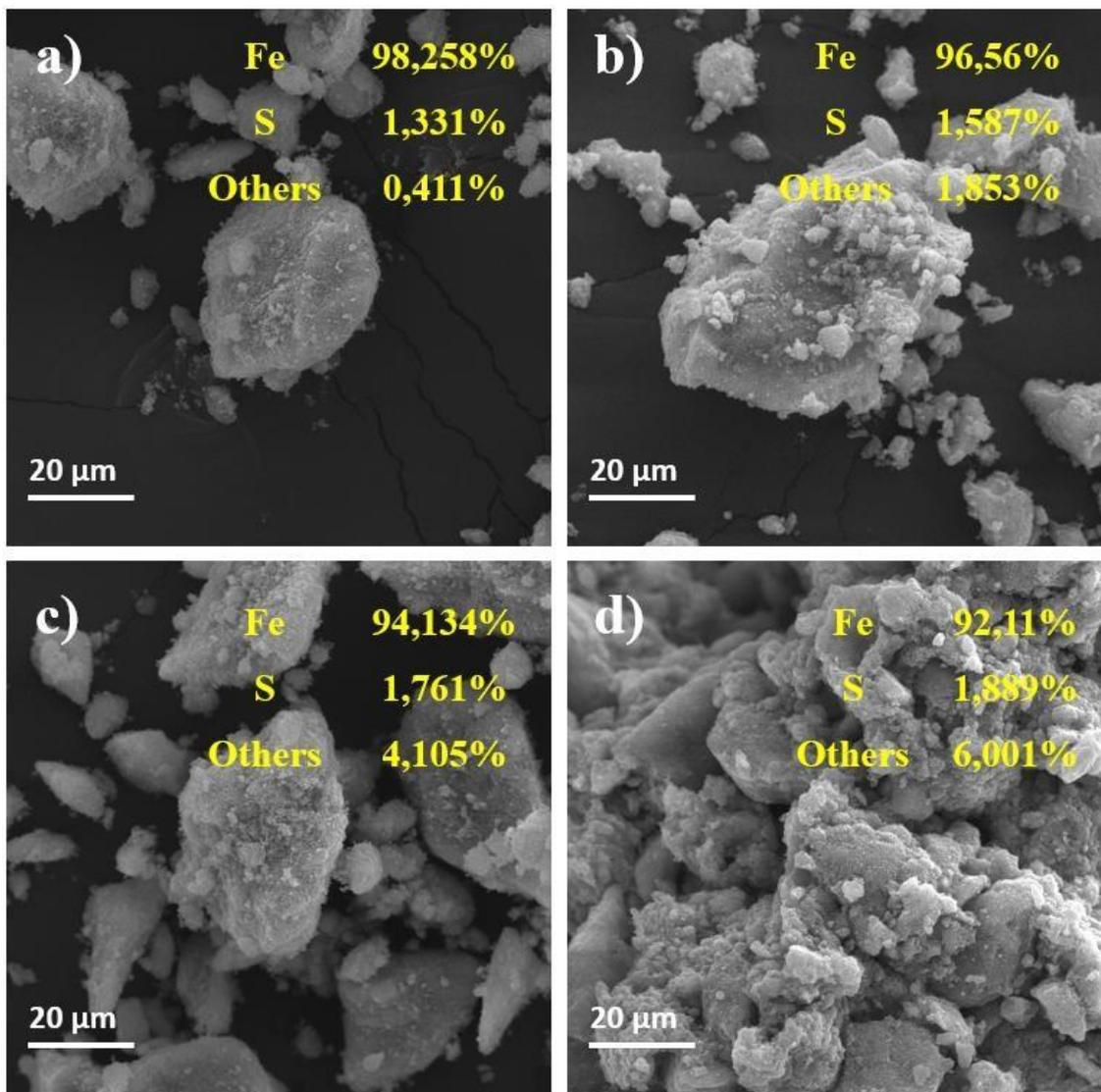


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Fluorescência de Raios-X (FRX)

Imagens de microscópio eletrônico de varredura (MEV) das amostras NPM, Fe₃O₄/APTES, Fe₃O₄/APTES_GLU e Fe₃O₄/APTES_GLU_ET 2.0, além dos mapas FRX (inserções), são apresentadas na Figura 5 - a), b), c), e d). Na figura é mostrado a morfologia do suporte e a sua porosidade. Pode ser observado também uma diferença na porosidade dos materiais, indicando uma rápida alteração na composição do material. De acordo com os espectros de FRX, há pequenas variações nas composições elementares, indicando pequenas diminuições nos átomos de Fe, devido ao revestimento deste material com APTES e GLU, além do aparecimento do S e de outros materiais, corroborando com a ideia de que mais materiais estão sendo adicionados ao suporte. Todas as imagens mostraram uma morfologia de superfície laminar. MEV e FRX serviram como análises complementares para determinar se a ET 2.0 estava imobilizada na superfície do suporte, formando assim o biocatalisador Fe₃O₄/APTES_GLU_ET 2.0.

Figura 5: Imagens VSM e FRX de: NPM - nanopartículas magnéticas (magnetita - Fe_3O_4); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ - magnetita funcionalizada com APTES (g-aminopropiltriétoxissilano); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU}$ - magnetita funcionalizada com APTES e ativada com GLU (glutaraldeído); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU_ET 2.0}$ - enzima EVERSAR[®] TRANSFORM 2.0 imobilizada em magnetita funcionalizada em APTES e ativada com glutaraldeído.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.3. Análise FTIR

A Figura 6 mostra os espectros de FTIR dos materiais avaliados e sintetizados. A banda 562 cm^{-1} aparece em todos os sistemas e refere-se às vibrações de Fe–O características da rede de espinélio presentes na fase magnética. Na Figura 6 (A), as

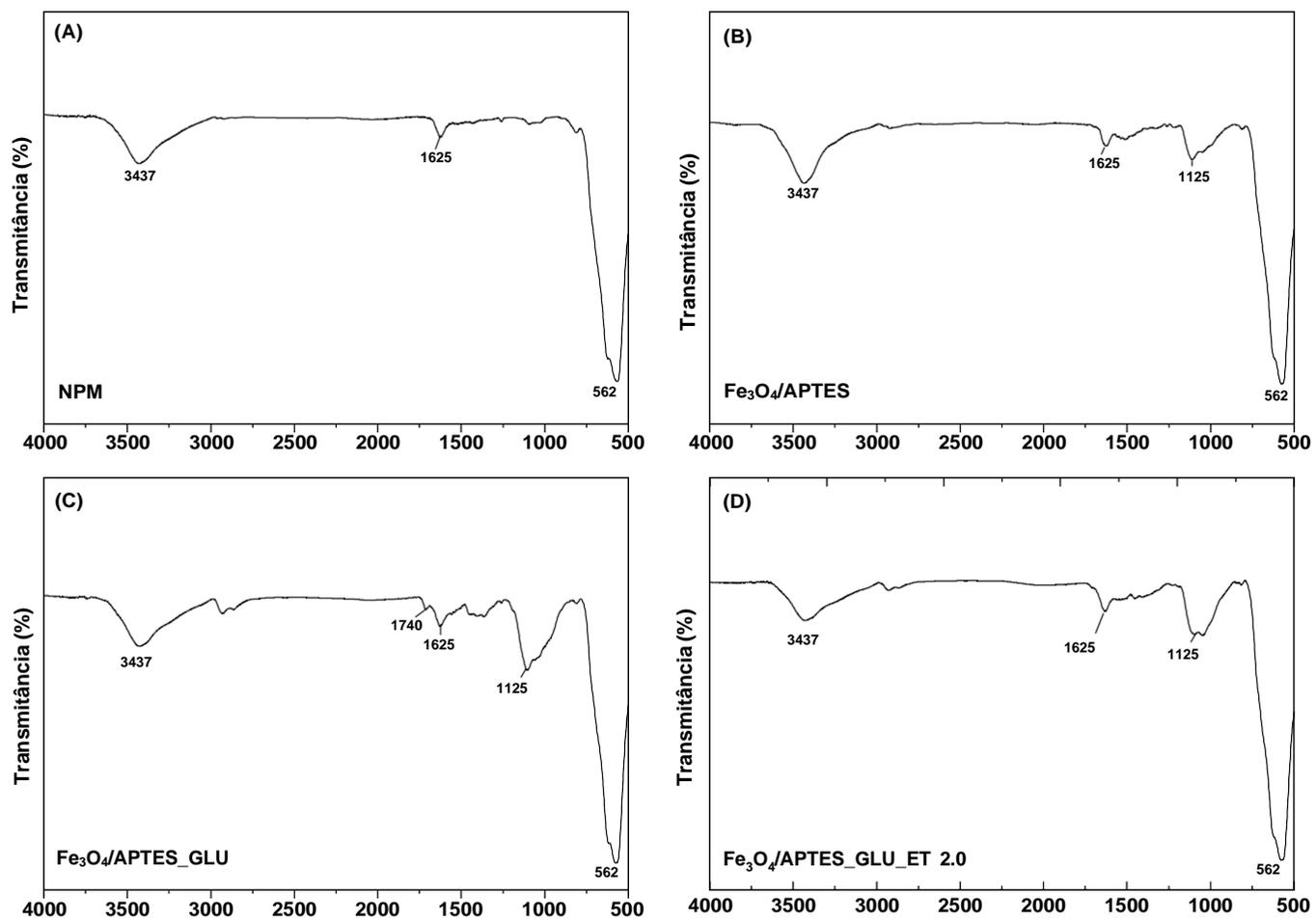
bandas posicionadas em 1625 e 3437 cm^{-1} podem ser atribuídas à vibração de flexão das moléculas de H_2O adsorvidas e dos grupos $-\text{OH}$ da superfície, respectivamente. Essas mesmas bandas estão localizadas nos outros sistemas ((B), (C) e (D)).

A Figura 6 (B) apresenta o espectro FTIR do composto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$. A banda de absorção em 1125 cm^{-1} é atribuída ao Fe-Si, confirmando a hipótese apresentada para o padrão de difração $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$, confirmando o revestimento superficial de nanopartículas de Fe_3O_4 após a etapa de funcionalização do APTES.

A ativação do composto $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ com glutaraldeído também foi investigada através de FTIR e o resultado é apresentado na Figura 6 (C). Este processo não alterou a banda característica da magnetita na estrutura. O espectro mostra o aparecimento de um pico em 1740 cm^{-1} , que representa a vibração de estiramento do $\text{CO}=\text{O}$ da molécula de aldeído, o que indica o processo de ativação do suporte com moléculas de glutaraldeído.

Na Figura 6 (D) é possível observar que a banda em 1740 cm^{-1} apresentou uma diminuição, provavelmente devido a ligação do grupo aldeído do glutaraldeído ao grupo amina da enzima que foi adicionado ao meio reacional.

Figura 6: Espectros de FTIR das amostras: nanopartículas magnéticas (magnetita - Fe_3O_4); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES}$ - magnetita funcionalizada com APTES (g-aminopropiltriétoxissilano); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU}$ - magnetita funcionalizada com APTES e ativada com GLU (glutaraldeído); $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{APTES_GLU_ET 2.0}$ - enzima EVERSA® TRANSFORM 2.0 imobilizada em magnetita funcionalizada em APTES e ativada com glutaraldeído.

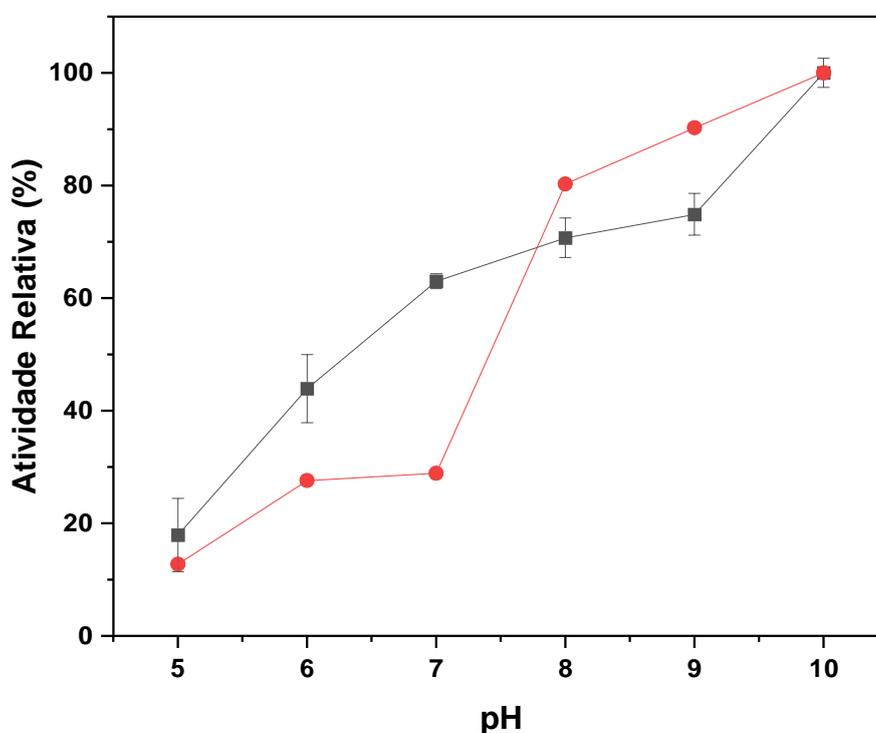


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3. Estudo de pH na atividade do biocatalisador e da lipase

O efeito do pH na lipase livre e imobilizada mostrou que ambas tiveram comportamentos semelhantes obtendo atividade máxima em pH 10, que foi o valor de pH alcalino mais alto estudado. Resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos por (Arana-Peña; Lokha; Fernández-Lafuente, 2018; Miranda et al., 2020).

Figura 7: Efeito do pH nas atividades da Eversa® Transform 2.0 livres (●) e Eversa® Transform 2.0 imobilizada em nanopartícula magnética (■). Atividade determinada utilizando *p*-NPB (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹).



Fonte: Elaborado pelo autor.

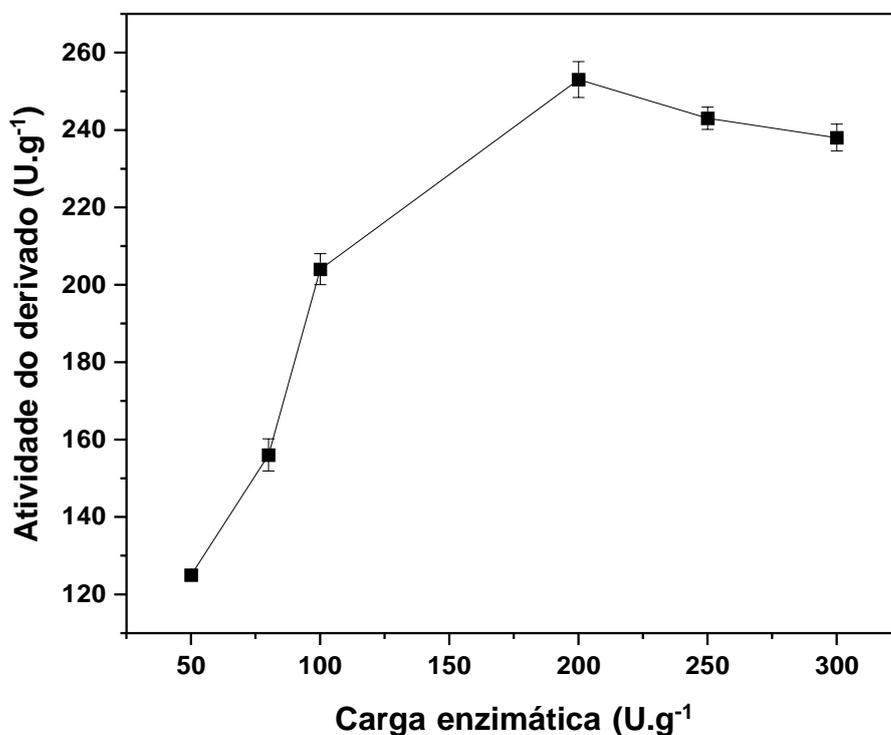
A Figura 7 mostra um acréscimo nas atividades da enzima livre e imobilizada conforme o pH foi aumentando de meio ácido para alcalino. Em meio ácido, a enzima imobilizada apresentou maior atividade em relação a enzima livre. Já em meio alcalino, a atividade da enzima livre foi maior que a da imobilizada, sendo iguais no pH 10, podendo ser justificado devido ao aumento da estabilidade da enzima e/ou alterações conformacionais causadas durante a imobilização.

4.4. Efeito da Carga Enzimática

O efeito da carga enzimática foi avaliado de 50 U.g⁻¹ a 300 U.g⁻¹, os resultados da atividade do derivado são apresentados na Figura 8. Através da análise do gráfico é possível identificar que com o aumento da carga enzimática, ocorreu um crescimento considerável no valor da atividade do derivado, sendo na carga de 200 U.g⁻¹ a maior atividade atingida. Cargas maiores de 250 U.g⁻¹ e 300 U.g⁻¹ resultaram na diminuição da atividade.

O comportamento apresentado com a variação da carga enzimática pode ser explicado pela análise das interações entre a enzima e o suporte (Souza, 2013). O aumento da atividade do derivado ocorre devido a uma quantidade maior de enzima inserida no meio permitindo mais interação proteína-proteína. A diminuição da atividade do derivado observada a partir da carga de 250 se dá por limitações difusionais, uma barreira de difusão de produto e substrato, e impedimento estérico o que explica a baixa atividade (Silva et al., 2012).

Figura 8: Efeito da carga enzimática (A_{td} , U.g⁻¹) na imobilização de Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A carga enzimática excessiva sempre causa interação proteína-proteína e inibe o alongamento flexível da conformação enzimática, o que resulta no impedimento estérico e, portanto, na inativação de uma enzima. Então, pode ser difícil para a molécula de enzima modular sua conformação mais adequada para capturar as moléculas do substrato e liberar as moléculas do produto sob condições de aglomeração molecular. (Zhang; Yuwen; Peng, 2013).

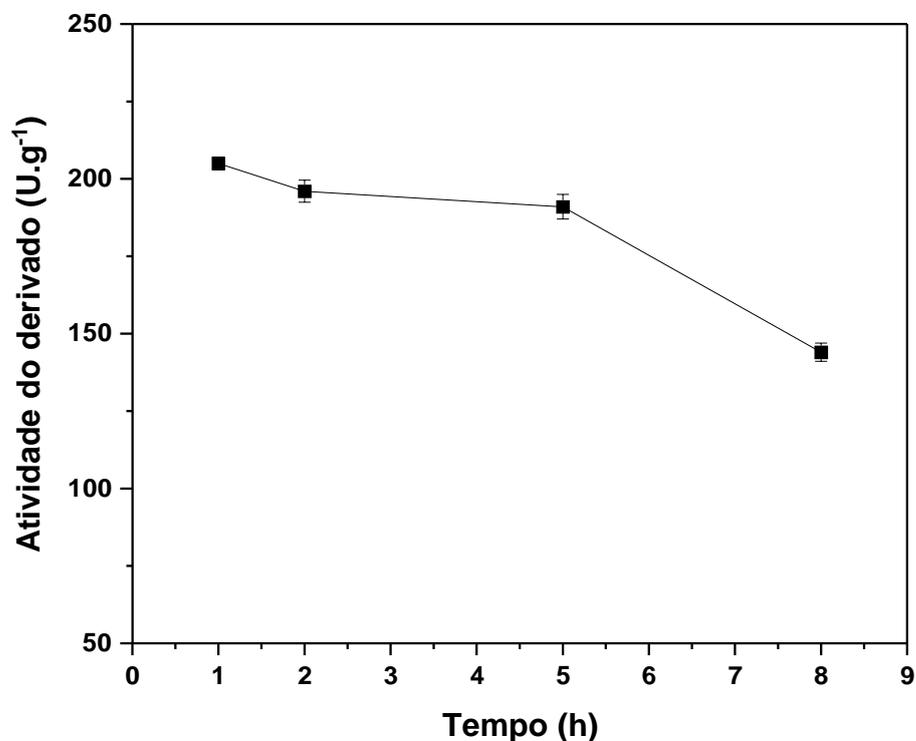
4.5. Efeito do tempo de contato

O efeito do tempo de contato foi avaliado em 1, 2, 5 e 8 horas, de acordo com a Figura 9. A carga enzimática manteve-se constante e a atividade máxima do derivado foi obtida em 1 hora, mostrando que o equilíbrio de contato enzima-suporte foi atingido rapidamente.

Costa et al, (2016), em seu estudo mostraram que a interação enzima-suporte de equilíbrio foi alcançada em 1h. Durante 4 horas, foi observada a máxima atividade derivada e somente após 4 horas foi observada uma diminuição na atividade catalítica.

Huang e Cheng (2008) relataram que é necessário um curto tempo de contato para, a imobilização da enzima em nanopartículas, devido à grande área superficial disponível, o que reduz a resistência à transferência de massa. Além disso, a modificação do suporte com APTES e glutaraldeído facilitou a rápida ligação da enzima por interações covalentes entre o grupo aldeído do glutaraldeído e os grupos amina da enzima (Costa *et al.*, 2016).

Figura 9: Efeito do tempo de contato (A_{td} , $U \cdot g^{-1}$) na imobilização de Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas.



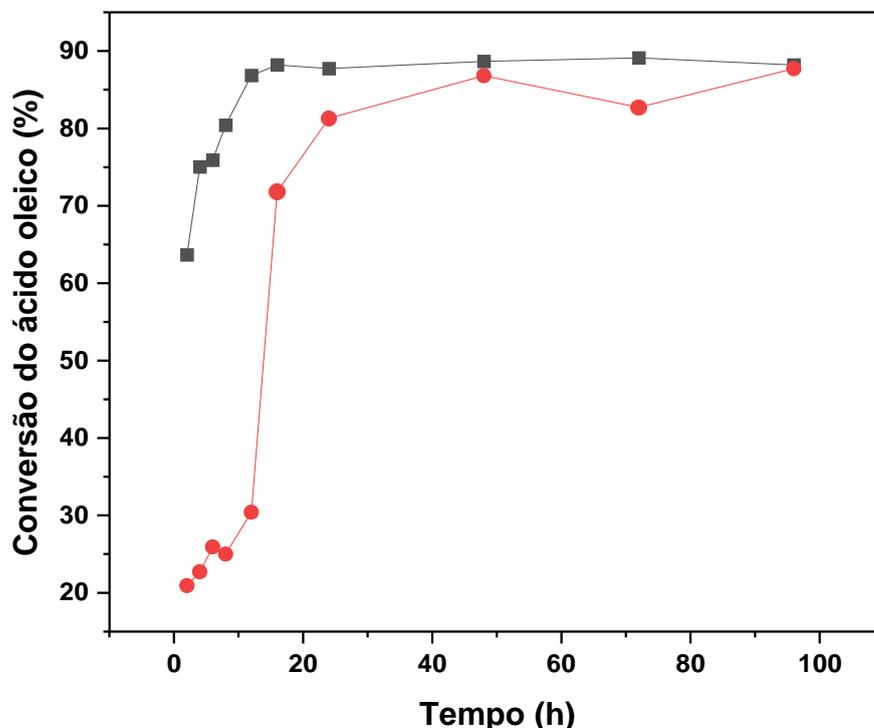
Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme a Figura 9, após 5 horas foi possível observar uma queda maior da atividade, provavelmente devido ao período mais longo de incubação, em que mudanças conformacionais e estruturais da enzima já eram esperadas ocasionando assim a sua desnaturação.

4.6. Esterificação Catalítica

A Figura 10 mostra a produção de ésteres na conversão do ácido oleico em oleato de etila. Nesse processo foi utilizada as melhores condições de imobilização para o biocatalisador, onde os testes foram avaliados no tempo de 2, 4, 6, 8, 12, 16, 24, 48, 72 e 96 horas, sob agitação de 150 rpm a 37°C. Pôde-se observar que após 16 horas de reação foi alcançada uma conversão de 88,1%.

Figura 10: Síntese de oleato de etila utilizando ET 2.0-NPM imobilizada (■) e Eversa® Transform 2.0 livre (●) com carga enzimática 200 U.g⁻¹, a 37°C, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas em agitação de 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Estudos realizados por Souza (2013); Miranda et al, (2020); e Brandão Junior et al, (2023) relatam a produção de biodiesel a partir de lipases imobilizada em nanopartículas magnéticas. A lipase *Candida antarctica* CALB foi estudada por Souza (2013), a reação de conversão do ácido oleico em oleato de etila foi de 90% em 48 horas de reação mantendo 85% da atividade catalítica por 9 ciclos. Brandão Junior et al., 2023, analisaram a produção de biodiesel no utilizando óleo de babaçu e tucumã tendo como biocatalisador ET 2.0-NPM, em seu estudo os resultados obtidos variaram de 68,7% a 82,2% para o babaçu e de 32,5% a 86,0% para o tucumã, com três ciclos de reaproveitamento e sem perda significativa de catalisador.

Miranda et al, (2020), estudaram a produção de biodiesel utilizando a Eversa® Transform 2.0 pela técnica de agregados enzimáticos reticulados (CLEAs), com nanopartículas magnéticas de sílica, na transesterificação do óleo de soja, obtendo um bom desempenho na produção de ésteres 89,8% após 12 horas de reação. O biocatalisador

foi reutilizado cinco vezes, sendo que no terceiro ciclo diminuiu para 76,4% que se manteve até o quinto. O uso do CLEA magnético apresentou uma fácil recuperação, já que puderam ser recuperados sem dificuldade com um campo magnético, permitindo sua reutilização. No entanto, parte da perda de atividade pode ser devida à liberação de alguns fragmentos não magnéticos dos CLEAs após possíveis quebras das partículas. Com base nos resultados obtidos e comparado com o que é relatado na literatura, nosso material pode ser caracterizado como sendo melhor devido um menor efeito difusional.

Podemos concluir com o estudo apresentado na Figura 10 que os dados da produção de biodiesel, a partir da lipase imobilizada em nanopartículas magnéticas, mostraram-se mais favoráveis em relação às enzimas livres devido a sua conversão se manter acima de 80% em ciclos consecutivos e sem reposição do catalisador, enquanto o procedimento da enzima livre em cada ponto estudado foi realizado com 100% das enzimas em cada processo.

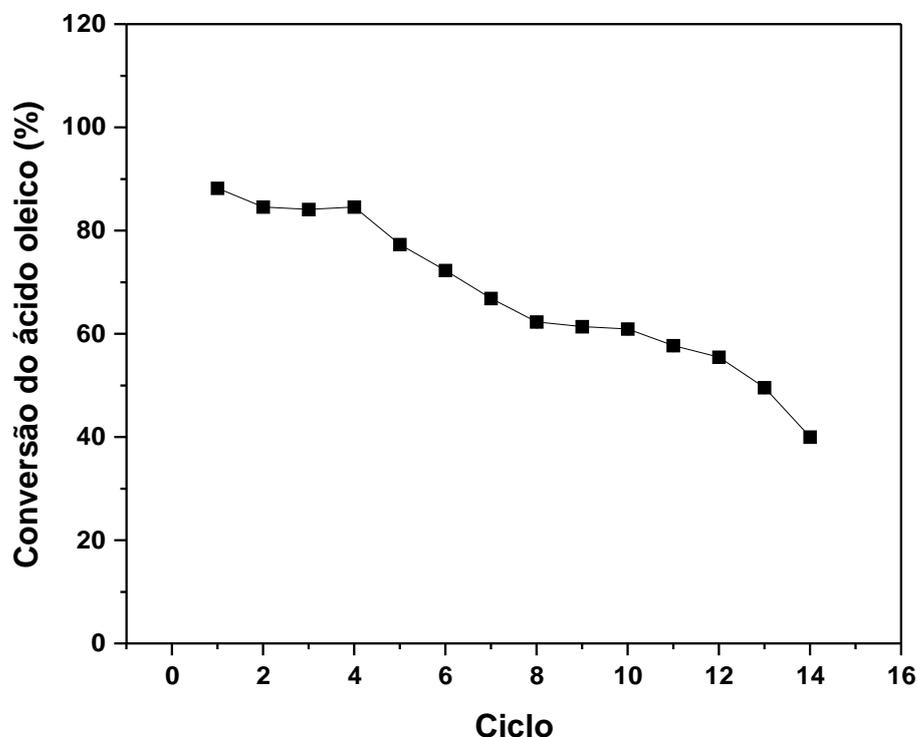
4.7. Estabilidade operacional

A estabilidade operacional foi avaliada em 14 ciclos consecutivos de 16 horas como representado na Figura 11. A razão molar, temperatura e velocidade de agitação foram baseados nos resultados da pesquisa realizada por Souza, (2013).

Brandão Junior et al, (2023) realizaram em sua pesquisa um estudo de 3 ciclos de 8 horas com os óleos de babaçu e tucumã obtendo uma conversão de conteúdo de ésteres de 82,2% e 86%, respectivamente, utilizando ET 2.0-NPM. O biocatalisador apresentou em geral uma diminuição sutil da atividade catalítica após os 3 ciclos, indicando um grau de estabilidade de desempenho.

Remonatto et al, (2022) avaliaram o reuso da lipase imobilizada por 7 ciclos, foi observado um alto teor de ésteres no primeiro e no segundo ciclo, 98% e 95%, respectivamente. A partir do terceiro ciclo apresentou menos de 20% do teor de ésteres.

Figura 11: Estabilidade operacional da síntese de oleato de etila utilizando ET 2.0-NPM carga enzimática 200 U.g⁻¹, a 37°C. Cada ciclo teve duração de 16 horas, sob agitação de 150 rpm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste trabalho a conversão do ácido oleico na produção de ésteres foi de 88,1% no primeiro ciclo. No 4º ciclo a conversão se manteve em torno de 80%, confirmando a produção de ésteres. A partir do 5º ciclo o valor da conversão foi diminuindo variando de 77% a 39,9%. Nesse último ciclo tivemos um acúmulo de 14 reciclos de 16 horas, já que as reações foram realizadas de forma contínua. Um catalisador que pode ser recuperado e reutilizado é interessante pois contribuem para a redução dos custos de processo, podendo assim viabilizar a produção do biodiesel pela rota enzimática, uma alternativa a rota química.

Razack; Duraiarasan, (2016) estudaram a reutilização de lipase imobilizada de culturas mistas em esferas de alginato de cálcio 2 % e, após 20 ciclos, ela manteve a atividade. Remonatto et al, (2018) observaram que após 3 ciclos de reuso, a atividade da enzima Sepabeads-Eversa® Transform 2.0 caiu apenas 25 % na produção de ésteres etílicos na transesterificação do óleo de girassol.

Martínez-sánchez et al, (2020) imobilizaram a Eversa Transform em matrizes de octadecil metacrilato. Esse biocatalisador foi usado para produzir biodiesel a partir de óleo de girassol e metanol na razão molar metanol:óleo de 3:1 em meio com terc-butanol como cosolvente. Após 25 horas de reação foi obtido um rendimento de 60% em ésteres metílicos de ácidos graxos.

Bresolin et al, (2019) imobilizaram a lipase NS-40116 em espuma de poliuretano. O biocatalisador imobilizado foi mais estável do que a enzima livre, principalmente em valores de pH ácidos. O derivado enzimático também foi utilizado para reações de esterificação e conversões em torno de 66% em ésteres metílicos de ácidos graxos. Foram obtidas utilizando gordura abdominal de frango, metanol 3 eqv, 5% (m/m) do biocatalisador, 2% (m/m) de água, a 30 °C, durante 24 horas. Sob essas condições, a conversão foi mantida até o quarto reuso do derivado enzimático.

5. CONCLUSÕES

Nesse estudo concluímos que as nanopartículas magnéticas modificadas por APTES e glutaraldeído proporcionam um suporte que resiste a enzima ativa, podendo manter por ciclos de reações consecutivas a atividade catalítica. Esse revestimento por APTES garantiu uma proteção para que não houvesse oxidação das nanopartículas evitando agregação delas e permitindo uma interação com os grupos aldeídos presentes no glutaraldeído.

O biocatalisador ET 2.0-NPM estudado no presente trabalho, mostrou-se bastante eficaz para a produção do oleato de etila. Quando aplicadas as melhores condições avaliadas, foi possível observar que a produção de éteres a partir da reação do ácido oleico com o etanol, sob ação do biocatalisador por 16 horas a 37 °C e 150rpm, resultou uma conversão de 88,1% para o derivado analisado.

A estabilidade operacional apresentada nos ciclos de reação, indica que o biocatalisador ET 2.0-NPM aplicado na produção de ésteres é eficiente, já que o mesmo pode ser separado e recuperado facilmente através da aplicação de um campo magnético, podendo substituir catalisadores químicos que são prejudiciais ao meio ambiente.

REFERÊNCIAS

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Biodiesel. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 02 Dez. 2023.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. (2020b).Especificação do biodiesel. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/biodiesel/especificacao-do-biodiesel>>. Acesso em: 02 Dez.2023.

AFZAL, H. A. et al. Epoxy functionalized polymer grafted magnetic nanoparticles by facile surface initiated polymerization for immobilization studies of Candida Antarctica lipase B. **Reactive and Functional Polymers**, v. 147, p. 104454, fev. 2020.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTER. Immobilization of Eversa Lipase on Octyl Agarose Beads and Preliminary Characterization of Stability and Activity Features. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 511, 2 nov. 2018.

ARANSIOLA, E. F. et al. A review of current technology for biodiesel production: State of the art. **Biomass and Bioenergy**, v. 61, p. 276–297, 2014.

ASHJARI, M. et al. Soluble enzyme cross-linking *via* multi-component reactions: a new generation of cross-linked enzymes. **Chemical Communications**, v. 56, n. 67, p. 9683–9686, 2020.

ATHAR, M.; ZAIDI, S. A review of the feedstocks, catalysts, and intensification techniques for sustainable biodiesel production. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 1862, p. 104523, 2020.

AVERSA, Isabella Fernandes Souza. Imobilização de tripsina suína em

nanopartículas magnéticas: atividade e estabilidade enzimática. 2022. 63 f.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas,
MG, 2022

BARRETO, A. C. H. et al. Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 12, n. 5, p. 677–686, 19 mar. 2012.

BEN. Balanço Energético Nacional 2023. EPE. Disponível em:
https://www.epe.gov.br/sites/pt/publicacoesdadosabertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-748/topico-681/BEN_S%C3%ADntese_2023_PT.pdf. Acesso em: 07 Out. 2023.

BEZERRA, C. S., LEMOS, C. M. G. F., SOUSA, M., GONÇALVES, L. R. B. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*. 132 (26): 4215, 2015.

BILAL, M., IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. *Coordination Chemistry Reviews*. 388:1–23. 2019.

BOUDRANT, Joseph; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochemistry*, v. 90, p. 66-80, 2020.

BRANDÃO JÚNIOR, J. et al. 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**, v. 13, n. 3, p. 571, 11 mar. 2023.

BRESOLIN, D. et al. Synthesis of a green polyurethane foam from a biopolyol obtained by enzymatic glycerolysis and its use for immobilization of lipase NS-40116. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 2, p. 213–

222, 26 fev. 2019.

Califano, V.; Costantini, A. Immobilization of Cellulolytic Enzymes in Mesostructured Silica Materials. *Catalysts* **2020**, *10*, 706.

<https://doi.org/10.3390/catal10060706>

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. *Química Nova*, v. 38, n. 3, p. 399-409, 2015.

CAVALCANTI, Marcello Henrique da Silva. Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas (Fe₃O₄) e seu uso como suporte para imobilização de lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL). 2020. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas/MG, 2020.

Cesarini, S.; Pastor, F.I.J.; Nielsen, P.M.; Diaz, P. Moving towards a Competitive Fully Enzymatic Biodiesel Process. *Sustainability* **2015**, *7*, 7884-7903. <https://doi.org/10.3390/su7067884>.

CHANG, M. Y.; CHAN, E.-S.; SONG, C. P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase-methanol tolerance and kinetic model. *Fuel*, v. 283, p. 119266, jan. 2021.

COSTA, V. M. et al. NANOBIOCATALYTIC SYSTEMS BASED ON LIPASE-Fe₃O₄ AND CONVENTIONAL SYSTEMS FOR ISONIAZID SYNTHESIS: A COMPARATIVE STUDY. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 33, n. 3, p.661–673, set. 2016.

DE OLIVEIRA, U. M. F. et al. Effect of the Presence of Surfactants and Immobilization Conditions on Catalysts' Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase onto Chitosan. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 184, n. 4, p. 1263-1285, 10 abr. 2018.

DE OLIVEIRA, V. F. et al. Fatty acid alkyl esters obtained from babassu oil using C1–C8 alcohols and process integration into a typical biodiesel plant.

Chemical Engineering Research and Design, v. 160, p. 224–232, ago. 2020.

DUARTE, V. et al. Biocombustíveis: uma revisão sobre o panorama histórico, produção e aplicações do biodiesel. **Meio Ambiente (Brasil)**, v. 4, p. 50–68, jul. 2022.

FARIAS, Marcela Yara Vasconcelos de. Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na produção de ésteres. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Química) UFC, 2017.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Strategies for enzyme stabilization by intramolecular crosslinking with bifunctional reagents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 6, p. 517–523, jun. 1995.

FERREIRA GONÇALVES, G. R. et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on activated carbon by adsorption and covalent bonding and its application in the synthesis of butyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 111, p. 114–123, dez. 2021.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2 set. 2019.

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

FREIRE, T. M. et al. Fast ultrasound assisted synthesis of chitosan-based magnetite nanocomposites as a modified electrode sensor. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 760–769, out. 2016.

FURLANI, I. L., AMARAL, B. S., OLIVEIRA, R. V., CASS, Q. B. Enzyme immobilization: concepts and effects on proteolysis. *Química Nova*. 43(4), 463-473.2020.

Homaei AA, Sariri R, Vianello F, Stevanato R. Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol*. 2013 Aug 29;6(4):185-205. doi: 10.1007/s12154-013-0102-9. PMID: 24432134; PMCID: PMC3787205.

HOSSEINZADEH-BANDBAFHA, Homa et al. A comprehensive review on the environmental impacts of diesel/biodiesel additives. **Energy Conversion and Management**, v. 174, p. 579-614, 2018.

HUANG, L.; CHENG, Z.-M. Immobilization of lipase on chemically modified bimodal ceramic foams for olive oil hydrolysis. **Chemical Engineering Journal**, v. 144, n. 1, p. 103–109, out. 2008.

JAKOVETIĆ TANASKOVIĆ, S. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 103–111, jan. 2017.

KHOORBAKHT, Golmohammad et al. Optimization of operating factors and blended levels of diesel, biodiesel and ethanol fuels to minimize exhaust emissions of diesel engine using response surface methodology. **Applied Thermal Engineering**, v. 99, p. 1006-1017, 2016.

KORDEL, M. et al. Extracellular lipase of *Pseudomonas* sp. strain ATCC 21808: purification, characterization, crystallization, and preliminary X-ray diffraction data. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 15, p. 4836–4841, ago. 1991.

LI, B. et al. Biodiesel preparation from high acid value phoenix seed oil using Eversa transform 2.0 as a novel catalyst. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 11, p. 9821–9830, 26 jul. 2023.

Dong-Mei Liu, Juan Chen, Yan-Ping Shi, Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 102, 2018, Pages 332-342, ISSN 0165-9936, <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.

Lotti M, Pleiss J, Valero F, Ferrer P. Enzymatic Production of Biodiesel: Strategies to Overcome Methanol Inactivation. *Biotechnol J*. 2018 May;13(5):e1700155. doi: 10.1002/biot.201700155. Epub 2018 Mar 6. PMID: 29461685.

Izabelly L. Lucena, Rosana M.A. Saboya, João F.G. Oliveira, Marcelo L. Rodrigues, Antônio E.B. Torres, Célio L. Cavalcante, Expedito J.S. Parente, Giovanilton F. Silva, Fabiano A.N. Fernandes, Oleic acid esterification with ethanol under continuous water removal conditions, *Fuel*, Volume 90, Issue 2, 2011, Pages 902-904, ISSN 0016-2361, <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2010.10.022>.

M.R. Avhad, J.M. Marchetti, A review on recent advancement in catalytic materials for biodiesel production, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Volume 50, 2015, Pages 696-718, ISSN 1364-0321, <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.05.038>.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, J. A. et al. Immobilized Biocatalysts of Eversa® Transform 2.0 and Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Comparison of Some Properties and Performance in Biodiesel Production. *Catalysts*, v. 10, n. 7, p. 738, 3 jul.2020.

Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 2004 Nov;37(5):790-6, 798-802. doi: 10.2144/04375RV01. PMID: 15560135.

MIRANDA, L. P. et al. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa®

Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 817, 22 jul. 2020.

MOHAMMADI, M. et al. A novel approach for bioconjugation of *Rhizomucor miehei* lipase (RML) onto amine-functionalized supports; Application for enantioselective resolution of rac-ibuprofen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 523–531, out. 2018.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 17 ago. 2019.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, fev. 2021.

MOSSOBA, M. M.; KRAMER, J. K. **Official methods for the determination of trans fats**. 2. ed. [s.l.] AOCS Press, 2010.

NETTO, C. G. C. M.; ANDRADE, L. H.; TOMA, H. E. Enantioselective transesterification catalysis by *Candida antarctica* lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 20, n. 19, p. 2299–2304, out. 2009.

OSUNA, Y. et al. Immobilization of *Aspergillus niger* lipase on chitosan-coated magnetic nanoparticles using two covalent-binding methods. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, p. 1437–1445, 11 ago. 2015.

Letícia L. Rade, Caroline O.T. Lemos, Marcos Antônio S. Barrozo, Rogério M. Ribas, Robson S. Monteiro, Carla E. Hori, Optimization of continuous esterification of oleic acid with ethanol over niobic acid, *Renewable Energy*, Volume 115, 2018, Pages 208-216, ISSN 0960-1481, <https://doi.org/10.1016/j.renene.2017.08.035>.

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

RAZACK, S. A.; DURAIARASAN, S. Response surface methodology assisted biodiesel production from waste cooking oil using encapsulated mixed enzyme. **Waste Management**, v. 47, p. 98–104, jan. 2016.

REMONATTO, D. **Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases Eversa Transform e Eversa Transform 2.0**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 3 jul. 2018.

REMONATTO, D. et al. Immobilization of Eversa Lipases on Hydrophobic Supports for Ethanolysis of Sunflower Oil Solvent-Free. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 194, n. 5, p. 2151–2167, 20 maio 2022.

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

SÁ, A.; MENESES, A.; ARAÚJO, P; OLIVEIRA, D . A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries, **Food Science & Technology**, Volume 69, Part A, Pages 95- 105. 2017.

SILVA, J. A. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 60, p. 16–24, jan. 2012.

SOUSA, I. G. DE. **Desenvolvimento de biocatalisadores enzimáticos utilizando suportes híbridos de quitosana e agarose contendo lipase Eversa Transform 2.0 e sua aplicação na síntese de biolubrificantes**. Redenção: Universidadeda Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, 2022.

SOUSA, R. R. et al. Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives. **Catalysis Science & Technology**, v. 11, n. 17, p. 5696–5711, 2021.

SOUZA, M. C. M. DE et al. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 681–690, jul. 2017.

SOUZA, M. C. M. DE. **Imobilização de lipase de *Candida Antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2013.

SOUZA, L. T., VERÍSSIMO, L. A., PESSELA, B. C., SANTORO, R. R.,

RESENDE, R. R., MENDES, A. A. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*. 4: 529-568 2017.

Syafiuddin, A., Chong, J. H., Yuniarto, A., & Hadibarata, T. (2020). The current scenario and challenges of biodiesel production in Asian countries: A review. *Bioresource Technology Reports*, 12, Article 100608. <https://doi.org/10.1016/j.biteb.2020.100608>

TORRES, J. A., NOGUEIRA, F. G. E., SILVA, M. C., LOPES, J. H.,

TAVARES, T. S., RAMALHO, T. C., CORRÊA, A. D. Novel eco-friendly biocatalyst: soybean peroxidase immobilized onto activated carbon obtained from agricultural waste. *RSC Advances*. 7(27), 16460–16466. 2017.

WAN, J. et al. Enzyme immobilization on amino-functionalized Fe₃O₄@SiO₂ via electrostatic interaction with enhancing biocatalysis in sludge dewatering. *Chemical Engineering Journal*, v. 427, p. 131976, jan. 2022.

YOUSEFI, M. et al. Fine Modulation of the Catalytic Properties of *Rhizomucor miehei* Lipase Driven by Different Immobilization Strategies for the Selective Hydrolysis of Fish Oil. *Molecules*, v. 25, n. 3, p. 545, 27 jan. 2020.

ZHANG, D.-H.; YUWEN, L.-X.; PENG, L.-J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. *Journal of Chemistry*, v. 2013, p. 1–7, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/946248>.

