



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

VALDILANE SANTOS ALEXANDRE

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE Eversa® TRANSFORM 2.0 EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS COM APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES: BUTIRATO DE ETILA E
BUTIRATO DE METILA**

REDENÇÃO-CE

2025

VALDILANE SANTOS ALEXANDRE

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0 EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS COM APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES:
BUTIRATO DE ETILA E BUTIRATO DE METILA**

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

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

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

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

REDENÇÃO - CE

2025

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

Alexandre, Valdilane Santos.

A381i

Imobilização da lipase eversa® transform 2.0 em nanopartículas magnéticas com aplicação na síntese de ésteres: butirato de etila e butirato de metila / Valdilane Santos Alexandre. - Redenção, 2025.
60f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, Programa de Pós-graduação em Energia e Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2025.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Cristiane Martins de Souza.
Coorientador: Prof. Dr^a. Juliana de França Serpa.

1. Nanopartículas. 2. Eversa® Transform 2.0. 3. Imobilização.
4. Ésteres. I. Título

CE/UF/BSCA

CDD 539.1

VALDILANE SANTOS ALEXANDRE

**IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0 EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS COM APLICAÇÃO NA SÍNTESE DE ÉSTERES:
BUTIRATO DE ETILA E BUTIRATO DE METILA**

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

Aprovada em: 21/05/2025

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARIA CRISTIANE MARTINS DE SOUZA**
Data: 18/06/2025 14:26:42-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **JULIANA DE FRANÇA SERPA**
Data: 17/06/2025 09:16:19-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **JOSE CLEITON SOUSA DOS SANTOS**
Data: 20/06/2025 10:39:07-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **JOAO BRANDAO JUNIOR**
Data: 17/06/2025 19:38:27-0300
Verifique em <https://validar.j6.gov.br>

Prof.^a Dr. João Brandão Júnior
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

AGRADECIMENTOS

Sou uma, mas não sou só!

A Deus pela proteção, graça imerecível e amor incondicional em insistir, amar e cuidar de alguém tão pequena como eu. Somente uma fé que se abalou, inabalável é.

A ancestralidade e a encantaria que guiam meus caminhos e sempre me mostram o caminho a seguir e me advertem quando me desvio.

A meus filhos, a quem amo demasiadamente e dedico esse trabalho. Kauê Porã e Annelise, vocês são a razão da minha insistência em fazer as coisas darem certo e a não desistir, e é por vocês que continuo todos os dias da minha vida.

A minha família, a quem sou eternamente grata, em especial minha mãe Suzenete que em todos os momentos e adversidades esteve ao meu lado, mesmo quando não concordava, meu pai Valdir por sempre se esforçar para garantir meu conforto e segurança, e minha irmã Valdiane, gratidão por me apoiarem e serem minha rede de apoio nessa jornada. Gratidão por sempre acreditarem em mim.

Aos meus avós Tereza e Cacique Sotero pelo incentivo e palavras de força e resistência.

A meus amigos de longa data que sempre, sem hesitar, estão de prontidão para oferecer apoio, acolhimento, boas conversas e que, nos momentos de desesperança, estão ao meu lado. Gratidão, Andressa, Maria, Kiuber, Rômulo, João, Damares, Clara,

A escola indígena do meu povo, Kanindé de Aratuba, Manoel Francisco dos Santos por toda compreensão e apoio durante a pós-graduação.

As minhas companheiras de jornada durante a pós-graduação, que foram mais do que colegas e seguraram minha mão em momentos de adversidades, que me acolheram com muito carinho, amor e paciência. Levarei a amizade de vocês até Deus permitir. Gratidão, Viviane, Kaiany e Juliana.

Aos demais colegas de trabalho do Laboratório de Biomassa, agradeço pelos momentos e as trocas de experiências, sem vocês a jornada não teria sido tão leve.

A minha orientadora e Prof^a. Dr^a. Maria Cristiane Martins de Souza, agradeço pela orientação, apoio, acolhimento, paciência e compreensão durante o percurso, os quais foram fundamentais para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Juliana de França Serpa, por todo apoio, discernimento, direcionamento e paciência, sua co-orientação foi essencial para o êxito dessa pesquisa.

A professora Ms. Viviane Bizerra de Castro pela participação como banca de qualificação e aos professores Dr. José Cleiton e Dr. João Brandão Júnior pela participação como membros na banca de qualificação e defesa desta dissertação.

A mim, pelo esforço e dedicação durante todo o meu percurso acadêmico.

[Eu] pensava que nós seguíamos caminhos já feitos, mas parece que não os há. O nosso ir faz o caminho.
- C. S. Lewis.

RESUMO

Neste estudo, a lipase Eversa® Transform 2.0 foi imobilizada em nanopartícula magnética de ferro (Fe_3O_4) com modificações na superfície destas utilizando γ -aminopropiltriethoxissilano (APTS) e o glutaraldeído (GLU) como agente ativador para o método de ligação covalente, com o objetivo na aplicação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila. A produção de ésteres nos processos bioquímicos é significativamente importante, especialmente na produção de aromas na indústria alimentícia e fragrâncias no setor de perfumes, cosméticas, em produtos farmacêuticos, pesticidas, para solventes de tintas e vernizes, plastificantes e de bebidas. A imobilização foi realizada na presença de 25 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7, 25 °C, 1h de tempo de contato enzima-suporte e carga enzimática 80 UpNPB.g⁻¹. O biocatalisador produzido (MN_APTS_GLU_EV) foi caracterizado por Difração de Raios X (DRX), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TGA), e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que indicaram a modificação do suporte com APTS e GLU, confirmando a imobilização efetiva da lipase. Condições operacionais e parâmetros foram avaliados durante o processo de síntese dos ésteres: tempo reacional (4, 6, 8, 10 e 12 h) e estabilidade operacional (14 ciclos consecutivos), sob agitação de 150 rpm a 25 °C, concentração molar de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, e todas as análises foram realizadas na presença do solvente orgânico hexano. As melhores conversões de tempo reacional do biocatalisador para a síntese dos ésteres foram 85% de conversão em 10 horas para o butirato de metila e 80,4% em 8 h de reação para o butirato de etila. Após avaliar o melhor tempo de conversão, foi realizado a estabilidade operacional, em que a conversão máxima de ambos ocorreu logo no início do estudo, em que a produção de butirato de metila foi de 85,8 % no 1º ciclo, e a maior produção de butirato de etila foi de 86,4% também no início do ciclo, além de ter se mostrado dentro da estabilidade esperada estável mesmo após 14 ciclos consecutivos, com ótimo desempenho de reutilização mantendo as conversões em torno de 82 e 84% para ambos os ésteres. Os resultados deste estudo demonstraram bom desempenho para o biocatalisador MN_APTS_GLU_EV na aplicação na síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila.

Palavras-Chave: Eversa® Transform 2.0; Nanopartículas; Imobilização; Ésteres.

ABSTRACT

In this study, the lipase Eversa® Transform 2.0 was immobilized on magnetic iron nanoparticle (Fe_3O_4) with surface modifications using γ -aminopropyltriethoxysilane (APTS) and glutaraldehyde (GLU) as an activating agent for the covalent bonding method, aiming for application in the synthesis of the esters methyl butyrate and ethyl butyrate. The production of esters in biochemical processes is significantly important, especially in the production of aromas in the food industry and fragrances in the perfume, cosmetics, pharmaceutical, pesticide, paint and varnish solvents, plasticizers and beverage sectors. Immobilization was carried out in the presence of 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7, at 25 °C, with a 1-hour enzyme-support contact time and an enzyme load of 80 UpNPB.g⁻¹. The produced biocatalyst (MN_APTS_GLU_EV) was characterized by X-ray Diffraction (XRD), Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA), and Scanning Electron Microscopy (SEM), which confirmed the modification of the support with APTS and GLU and the effective immobilization of the lipase. Operational conditions and parameters were evaluated during the ester synthesis process, including reaction time (4, 6, 8, 10, and 12 hours) and operational stability (14 consecutive cycles) under 150 rpm agitation at 25 °C, molar concentration of 0.2 mol/L, and a molar ratio of 1:5 for methyl butyrate and 1:3 for ethyl butyrate, with all analyses performed in the presence of the organic solvent hexane. The best reaction time conversions of the biocatalyst for ester synthesis were 85% conversion in 10 hours for methyl butyrate and 80.4% in 8 hours for ethyl butyrate. After evaluating the best conversion time, operational stability was assessed, where the maximum conversion of both esters occurred at the beginning of the study, with methyl butyrate production reaching 85.8% in the first cycle, and ethyl butyrate production peaking at 86.4% also in the first cycle. Furthermore, the biocatalyst remained practically stable even after 14 consecutive cycles, demonstrating excellent reuse performance, maintaining conversions around 82% and 84% for both esters. The results of this study demonstrated the good performance of the MN_APTS_GLU_EV biocatalyst in the application for the synthesis of methyl butyrate and ethyl butyrate.

Keywords: Eversa® Transform 2.0; Magnetic nanoparticles; Immobilization; Methyl butyrate; Ethyl butyrate.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Métodos de imobilização enzimática.....	21
FIGURA 2 - Mecanismo da reação de estereificação catalisada por enzimas.....	25
FIGURA 3 - Equema do processo de imobilização enzimática.....	28
FIGURA 4 - Espectros de FTIR das amostras: (a) MNs - nanopartículas magnéticas; (b) MNs_APTS - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS; (c) MNs_APTS_GLU - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído; (d) MNs_APTS_GLU_EV - e nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®.....	31
FIGURA 5 - Curvas termogravimétricas para (A) e (B): MNs - nanopartículas magnéticas; MNs_APTS - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS; MNs_APTS_GLU - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído e MNs_APTS_GLU_EV - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®.....	33
FIGURA 6 - Perfis DRX dos suportes biocatalizadores: (a) MNs - nanopartículas magnéticas; (b) MNs_APTS - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS; (c) MNs_APTS_GLU - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído; (d) MN_APTS_GLU_EV - e nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®.....	35
FIGURA 7: Efeito do tempo de reação na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas através do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV , carga enzimática: 80 UpNPB.g ⁻¹ , a 25 °C, 150 rpm, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, nos períodos de 4, 6, 8, 10 e 12 horas de reação. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano).....	38
FIGURA 8: Estabilidade operacional na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas através do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV , carga enzimática: 80 UpNPB.g ⁻¹ , temperatura 25 °C, 150 rpm, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 8 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano)	4

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas e suas aplicações biotecnológicas.....	23
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTS	γ -aminopropiltrietoxissilano
<i>p</i>NPB	<i>p</i> -nitrofenila
<i>p</i>NP	<i>p</i> -nitrofenila
GLU	Glutaraldeído
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
DRX	Difração de Raio X
TG	Análise termogravimétrica (TG)
MNs	Nanopartículas Magnéticas
MNs_APTS	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS
MNs_APTS_GLU	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído
MNs_APTS_GLU_EV	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1 OBJETIVO GERAL.....	18
1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1. Enzimas.....	19
2.2. Lipases.....	20
2.3. 1 Lipase de <i>Aspergillus oryzae</i> (Eversa® Transform 2.0).....	22
2.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	23
2.4.1. Imobilização em nanopartículas magnéticas.....	24
2.5. ÉSTERES.....	26
3. METODOLOGIA.....	28
3.1. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
3.2. Síntese de nanopartículas de magnetita.....	29
3.3. Tratamento do suporte com g-aminopropiltrietoxissilano (APTS).....	29
3.4. Reticulação com solução de glutaraldeído (GLU).....	29
3.5. Imobilização Enzimática.....	30
3.6. Síntese e Cinética do biocatalisador.....	31
3.7. Reuso do biocatalisador.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1. Caracterização das nanopartículas magnéticas e biocatalisadores.....	33
4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourie(FTIR).....	33
4.1.2. Análise termogravimétrica (TG).....	36
4.1.3. Difração de Raios X (DRX).....	38
4.1.4. Efeito do tempo de contato.....	41
4.1.5. Estabilidade operacional.....	43
5 CONCLUSÃO.....	47
6 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A busca por processos químicos considerados ecologicamente corretos tem sido um dos grandes desafios para a pesquisa e para a indústria, sendo necessário aprimorá-los, visando à redução de resíduos tóxicos indesejados no meio ambiente (Wang et al., 2023). Um dos principais problemas nesse cenário é o uso de catalisadores químicos tóxicos que são negligenciados, pois eles desempenham um papel importante como mediadores de reações importantes usadas industrialmente. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas são consideradas catalisadores "verdes" ou biocatalisadores, nesse caso sendo altamente seletivos e reduzindo a ocorrência de reações indesejadas. A utilização desses biocatalisadores nos processos enzimáticos favorece a demanda industrial (Teixeira e Milagre, 2020). Além disso, a evolução dirigida de enzimas tem permitido substituir reagentes químicos tóxicos em diversos processos industriais, contribuindo para o desenvolvimento de uma química mais sustentável (Sarwan et al., 2024).

Os biocatalisadores, como enzimas e microrganismos, desempenham um papel fundamental em diversas indústrias, incluindo os processos farmacêuticos, alimentares e de biocombustíveis. Eles oferecem vantagens significativas em relação aos catalisadores químicos tradicionais, como maior especificidade, menor consumo de energia e impacto ambiental reduzido. De acordo com a literatura científica, a utilização de biocatalisadores permite processos mais sustentáveis e eficientes, além de minimizar a necessidade de reagentes tóxicos (Luz et al., 2020). A biotecnologia moderna tem desenvolvido métodos para otimizar a aplicação de biocatalisadores, incluindo a imobilização enzimática e engenharia genética (Rodríguez-Núñez et al., 2023) de microrganismos com o objetivo de aumentar sua estabilidade e eficiência (Souza et al., 2023). Essas abordagens têm sido amplamente estudadas para melhorar a viabilidade comercial dos biocatalisadores em larga escala (Zatta, Filho & Freitas, 2019). Além disso, os biocatalisadores apresentam alta seletividade, permitindo reações químicas mais precisas e reduzindo a formação de subprodutos indesejáveis, o que é um fator crítico na indústria farmacêutica e na síntese de compostos orgânicos complexos (Jagtap et al., 2024).

Outro aspecto relevante é a viabilidade econômica do uso de biocatalisadores. Apesar de custos iniciais mais elevados em comparação com catalisadores sintéticos, a eficiência operacional e a capacidade de reutilização de algumas enzimas podem compensar esses custos

ao longo do tempo (Almeida *et al.*, 2024). Segundo estudos de Žnidaršič-Plazl, (2021) e Alcántara *et al.*, (2022) indicam que processos baseados em biocatalisadores podem reduzir significativamente os gastos energéticos e os resíduos industriais, tornando-se uma alternativa atrativa para empresas preocupadas com a sustentabilidade e com conformidade regulatória (Srivastava *et al.*, 2024). Além disso, a engenharia de proteínas tem permitido a criação de enzimas mais resistentes a condições extremas, como altas temperaturas e pH variado, ampliando sua aplicabilidade industrial (Cea *et al.*, 2024).

Apesar dos grandes benefícios da utilização dos biocatalisadores, algumas desvantagens ainda persistem (Queissada *et al.*, 2020). Estas desvantagens estão associadas à estabilidade, pureza da enzima, disponibilidade e na impossibilidade de sua reutilização na forma solúvel livre. (Denti, 2021). Uma solução para contornar estes inconvenientes tem sido a imobilização destas enzimas. As lipases têm sido imobilizadas através de vários métodos, nomeadamente de adsorção, cross-linking, adsorção seguida de cross-linking, ligação covalente multipontual e aprisionamento físico. (Oliveira *et al.*, 2021).

Desse modo, um dos pontos motivadores para as pesquisas atuais, referente ao tema, é a busca por esses catalisadores "verdes", considerados adequados devido às vantagens em que os catalisadores homogêneos possuem (elevada atividade, seletividade e reprodutibilidade), bem como os catalisadores heterogêneos (alto período de repouso e facilidade de recuperação), além de não serem danosos ao meio ambiente.

O emprego de suportes sólidos para a imobilização enzimática é necessário devido à possibilidade de reuso do biocatalisador e para favorecer a estabilidade da enzima. A escolha do biocatalisador é essencial nesse processo, pois apresenta grande influência no processo de separação, recuperação e reutilização do catalisador (Cavalcante *et al.*, 2024).

Nesse contexto, o uso de nanopartículas magnéticas como suporte sólido atribui ao biocatalisador um dos requisitos essenciais: a facilidade de recuperação por simples aplicação de campo magnético. Segundo Karaagac *et al.*, (2024) o superparamagnetismo permite a esses materiais grande facilidade de isolamento e separação de meios multifásicos complexos pelo simples uso de um ímã permanente, e sua fácil dispersão após o término em aplicação do campo. A preparação de nanomateriais com propriedades magnéticas e superfícies reativas permite a imobilização de enzimas, possibilitando uma maior recuperação e reutilização do biocatalisador, atendendo aos princípios da química verde (Cavalcante *et al.*, 2024). Assim, a imobilização enzimática em nanopartículas

magnéticas potencializa a eficiência catalítica, unindo estabilidade e reutilização ao alto desempenho das enzimas.

As enzimas constituem uma classe significativa de proteínas que atuam como agentes facilitadores ou catalisadores de processos biológicos associados à função dos seres vivos. As enzimas são importantes para o funcionamento do organismo agem como dispositivos moleculares altamente específicos capazes de desmontar, formar ou transformar moléculas (Sarwan, 2024). As enzimas são compostas orgânicos de origem proteica ou, ocasionalmente, glicoproteica. Elas atuam diminuindo a energia necessária para ativar reações bioquímicas, sem alterar seu equilíbrio, já que não são consumidas no processo (De oliveira 2023). Esta função posiciona as enzimas como catalisadores biológicos, uma vez que têm a capacidade de acelerar ou até mesmo promover reações bioquímicas de substratos em produtos que, sem a sua presença, provavelmente não ocorreriam ou seriam excessivamente lentas (Ferrer e Świderek, 2024). As enzimas podem ser produzidas a partir de materiais animais, vegetais ou microbiológicos. As fontes microbianas são preferidas do ponto de vista econômico e industrial devido ao custo relativo de seu isolamento. De acordo com a literatura, estima-se que aproximadamente 35% dos processos bioquímicos contemporâneos sejam realizados pela classe das lipases. (Al Dahhan, Baghdadi e Alkattan, 2024).

Biocatalisadores, especialmente enzimas, têm recebido atenção significativa na química orgânica como alternativas aos processos químicos convencionais devido às suas inúmeras vantagens (Jagtap *et al.*, 2024). Entre elas, destacam-se o funcionamento em condições mais brandas, a compatibilidade com substratos sintéticos, a capacidade de catalisar reações reversíveis em alguns casos e a alta seletividade para reações específicas. Esses atributos têm impulsionado avanços na produção e comercialização de enzimas, fomentando novas aplicações industriais que demandam constante inovação (Buller *et al.*, 2023). Historicamente, o alto custo das enzimas representou uma barreira significativa para seu uso comercial, apesar de suas vantagens tecnológicas (Wang *et al.*, 2023). No entanto, os avanços recentes em engenharia enzimática e otimização de processos superaram esses desafios econômicos, tornando as enzimas uma alternativa viável aos catalisadores sintéticos (Planas-Iglesias *et al.*, 2021).

Os ésteres também são responsáveis por aplicações em fragrâncias e aromas, tendo propriedades sensoriais relativamente agradáveis. Os ésteres butirato de metila e butirato de

etila são obtidos através da reação de esterificação, que acontece entre um ácido carboxílico e um álcool (De Haro *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2022). A presente pesquisa utiliza o ácido butírico que reage com os álcoois metanol e etanol, sendo catalisada por um biocatalisador enzimático de nanopartícula magnética, utilizando uma enzima lipase, a Eversa® Transform 2.0 (Mantha *et al.*, 2019). A imobilização da enzima em um suporte magnético favorece um ambiente estável, o que favorece em sua atividade enzimática, reutilização do biocatalisador e vida útil, podendo ser realizada em condições diversas, empregando um método sustentável para a produção de ésteres (Deng *et al.*, 2020).

O éster metílico do ácido butírico, ou butirato de metila, possui aroma de frutas e relativamente forte, semelhante a fruta de abacaxi. O butirato de metila está presente em quantidades baixas em produtos de origem vegetal, além de ser fabricado, mesmo que em pequena escala, em perfumarias ou como aromatizante alimentar (Dange; Kulkarni; Rathod, 2015). Similarmente, o éster etílico do ácido butírico, ou butirato de etila, também é responsável por um aroma frutado doce, muito empregada em perfumes e alimentos (Friedrich *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 1991). Ambos podem ser obtidos através da reação de esterificação

Portanto, o presente trabalho aborda a aplicação das melhores condições para o uso eficiente de biocatalisadores enzimáticos suportados em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em reações de interesse industrial, de acordo com metodologias desenvolvidas por Sousa *et al.*, (2013) e Bizerra (2024). Especificamente, serão discutidas as questões relacionadas à manutenção da eficiência catalítica após a imobilização em nanopartículas magnéticas e a eficiência catalítica frente a reações de produção de ésteres.

1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é analisar a imobilização da lipase comercial Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em reação de interesse comercial: a produção de dois ésteres, butirato de metila e butirato de etila

1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar e aplicar as condições operacionais ideais, baseada nos estudos descritos por Souza *et al.*, (2013), no estudo da síntese dos ésteres butirato de metila e butirato de etila avaliados neste trabalho.
- Imobilizar a Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas por ligação covalente e comprovar sua eficiência como suporte (MNs_APTS_GLU_EV);
- Avaliar o desempenho do novo biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV (nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®) na síntese de ésteres: butirato de metila e butirato de etila;
- Sintetizar e caracterizar o material magnético (FTIR, TG e DRX) além de avaliar sua estabilidade operacional;
- Estudar e avaliar o potencial de reutilização do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV por meio de ciclos consecutivos de ocorrência

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ENZIMAS

Enzimas são proteínas especializadas que desempenham um papel fundamental em processos bioquímicos dentro de organismos vivos. Atuando como catalisadores biológicos, elas aceleram reações químicas sem serem consumidas ou alteradas no processo. Esses biocatalisadores são compostos de subunidades de aminoácidos ligadas por ligações peptídicas, permitindo que facilite várias reações com alta especificidade e eficiência (Scheibel *et al.*, 2024).

As enzimas exibem estabilidade notável sob condições específicas de temperatura e pH, tornando-as ferramentas versáteis em aplicações industriais e farmacêuticas (Weng *et al.*, 2024). Sua capacidade de funcionar em ambientes diversos, incluindo solventes orgânicos, expande seu potencial para catalisar reações de síntese, mantendo sua integridade estrutural (Hansda *et al.*, 2024). Avanços na engenharia de enzimas e técnicas de imobilização aumentam ainda mais sua estabilidade e reutilização, reforçando sua importância na química sustentável e verde (Mishra *et al.*, 2024).

A função catalítica das enzimas está diretamente ligada à sua capacidade de interação com os substratos, permitindo a formação de complexos específicos que facilitam as reações bioquímicas (Singh *et al.*, 2024). Essa interação ocorre na região ativa da enzima, onde o substrato se liga, influenciado por fatores como a conformação estrutural e a presença de resíduos específicos que estabilizam a ligação (Wang *et al.*, 2024).

A especificidade catalítica das enzimas decorre do arranjo preciso dos átomos na região ativa, garantindo que apenas determinados substratos sejam reconhecidos e convertidos em produtos. Essa especificidade é modulada por interações químicas, como ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas, que ajudam a posicionar o substrato de maneira ideal para a reação (Kuznetsova *et al.*, 2024). Além disso, estudos mostram que mutações em regiões distantes do sítio ativo podem influenciar a conformação da enzima e, consequentemente, sua eficiência catalítica (Zhang *et al.*, 2024).

A compreensão do papel desses biocatalisadores no processo de catálise foi definida com base no conceito de sítio ativo ou sítio catalítico, devido à sua singularidade em relação aos substratos com os quais podem interagir. Este é caracterizado como uma área tridimensional

da enzima que possibilita a interação específica com o substrato e é o local da reação química (Silva, 2012; Cavalcanti, 2020).

Os processos enzimáticos estão ganhando destaque na indústria devido à sua alta eficiência, seletividade e capacidade de reduzir o consumo de matéria-prima, produtos químicos e energia quando comparados a processos químicos tradicionais (Haghighi *et al.*, 2024). Atualmente, estima-se a existência de aproximadamente 5.500 enzimas, classificadas com base no tipo de reação que catalisam, sendo amplamente aplicadas em biotecnologia e indústrias sustentáveis (Soyombo, 2024).

Dentre essas enzimas, as lipases se destacam por sua versatilidade em reações catalíticas, especialmente em ambientes orgânicos com baixo teor de água. Elas são amplamente utilizadas em processos como transesterificação e esterificação, essenciais para a produção de biodiesel e biolubrificantes (Al Dahhan *et al.*, 2024). A facilidade de uso e a capacidade de atuar em diferentes substratos tornam essas enzimas promissoras para diversas aplicações industriais (Basheer & Masri, 2024). As enzimas em geral são classificadas em sete grupos principais: oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases. (IUPAC-IUBMB, 1999; Matsuta 2013). Dentre essas, as hidrolases, como proteases, celulasas, amilases e lipases, são as mais amplamente estudadas na química orgânica devido à sua disponibilidade, baixo custo e alta especificidade (Romano, 2020). Destacam-se, em particular, as lipases, que são versáteis e utilizadas não apenas na hidrólise de ésteres graxos, mas também em reações de policondensação, transesterificação, polimerizações por abertura de anéis e modificações de polímeros. Essa versatilidade, combinada com sua independência de cofatores, posiciona as lipases como biocatalisadores essenciais nas aplicações industriais (Wiltschi *et al.*, 2020; Zhao, 2024).

Os avanços em técnicas de imobilização enzimática e engenharia computacional ampliaram ainda mais suas aplicações, melhorando sua estabilidade e reutilização em diversas condições (Silva *et al.*, 2022). Além disso, a integração da biocatálise com princípios de química verde tem permitido o desenvolvimento de processos industriais ambientalmente sustentáveis (Intasian *et al.*, 2021).

2.2 LIPASES

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) destacam-se como as enzimas de maior relevância na síntese orgânica, graças à sua capacidade de realizar reações de bioconversão em

diversas aplicações industriais. Elas são amplamente utilizadas em setores como biocombustíveis, detergentes, alimentos, cosméticos, cuidados pessoais e farmacêuticos (De Souza *et al.*, 2018).

São consideradas o terceiro maior grupo enzimático em termos de preço de mercado. Esse grupo enzimático é largamente utilizado com aditivo em alimento, cosméticos, detergentes, produtos químicos finos, tratamento de águas residuais fabricação de papel. Essas enzimas são produzidas por diversos microorganismos, plantas etc., porém devido à grande variedade das atividades catalíticas e sua facilidade de manuseio genético, as enzimas provenientes de microorganismos tem maior uso do que as que são provenientes das plantas (Simoes, 2020). As enzimas que são a partir de microorganismos possuem maior estabilidade e uma produção mais segura e eficaz. (Lima, 2024).

As lipases foram concebidas originalmente para catalisar ligações éster através de reações de hidrólise que consomem simultaneamente moléculas de água. Contudo, levando em conta o princípio da reversibilidade, também ocorre a reação inversa na síntese de éster. (Gupta, Sood e Kaur, 2023). Elas também possuem a capacidade de catalisar outras reações que requerem substratos específicos, como a aminólise e a glicerólise (Stergiou *et al.*, 2013).

Os biocatalisadores industriais, como as lipases, têm despertado grande interesse por sua versatilidade e eficácia em vários processos. Adicionalmente, são notáveis pelo seu papel em usos ambientais, como o tratamento de águas residuárias (Facin *et al.*, 2021); (Pereira *et al.*, 2022).

2.3.1 Lipase de *aspergillus oryzae* (eversa® transform 2.0)

A lipase (Eversa® Transform 2.0) derivada *Aspergillus oryzae* destaca-se como uma solução inovadora no desenvolvimento de biocatalisadores industriais, especialmente para a produção de biodiesel. Desenvolvida pela Novozymes, essa enzima foi lançada comercialmente em 2014, com foco na conversão de óleos residuais e gorduras animais em biocombustíveis (Monteiro *et al.*, 2021; Chang *et al.*, 2021).

Embora sua utilização seja frequentemente feita de maneira livre, conforme sugerido pelo fornecedor, o processo de imobilização tem mostrado capacidade para aprimorar consideravelmente suas propriedades catalíticas. A fixação da enzima em suportes como nanopartículas magnéticas, agarose (polímero natural derivado de algas, poroso e hidrofílico)

ou Sepabeads (resinas sintéticas porosas usadas para imobilização de biomoléculas) pode potencializar sua estabilidade térmica e química, aprimorar sua atividade e permitir sua reutilização em diversos ciclos de reação (Facin *et al.*, 2021); (Miranda *et al.*, 2021).

A utilização de Eversa® Transform 2.0 imobilizada em sistemas hidrofóbicos ou híbridos tem viabilizado processos mais sustentáveis, como a produção de biodiesel em meios sem solventes, atingindo índices de conversão superiores a 90% e mantendo uma eficiência satisfatória após vários ciclos de utilização (Monteiro *et al.*, 2024). Esses avanços enfatizam a relevância da imobilização de enzimas como instrumento para a engenharia enzimática e para ampliação das aplicações industriais de biocatalisadores (Miranda *et al.*, 2020); (Lima, 2024).

2.4 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização enzimática é uma das técnicas mais relevantes para a aplicação de catálise enzimática em reações sintéticas conduzidas em solventes orgânicos. A utilização de enzimas imobilizadas apresenta diversas vantagens, especialmente porque a maioria das enzimas é insolúvel em solventes orgânicos. Dentre os benefícios de usar catalisadores heterogêneos, destaca-se a possibilidade de reutilização sem perdas significativas de atividade, o que traz vantagens econômicas como por exemplo diminuição dos custos operacionais e facilidade de purificação do produto final para aplicações comerciais (Patil *et al.*, 2023).

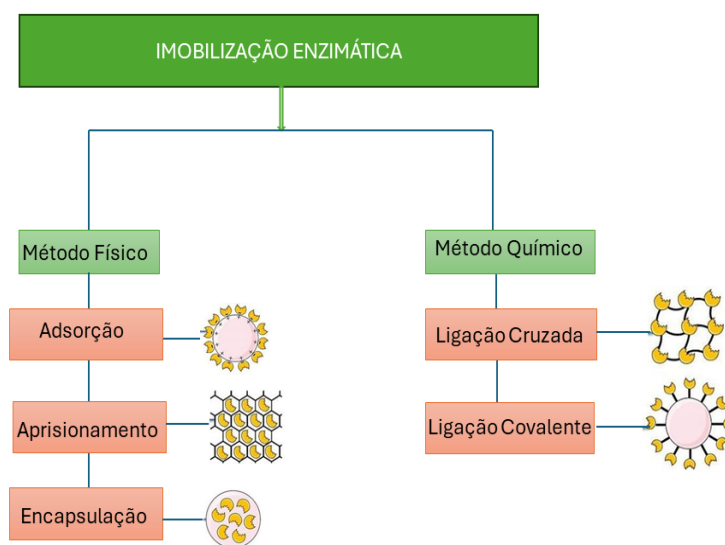
Além disso, as lipases podem ser imobilizadas por processos simples de adsorção, que requerem baixo custo energético preservam as características naturais das enzimas. Esse processo gera produtos altamente estáveis e permite o uso de suportes que prolongam a meia-vida das enzimas imobilizadas (Pereira *et al.*, 2015).

As lipases são frequentemente escolhidas para imobilização devido à sua versatilidade em reações de hidrólise e síntese de ésteres. Essas enzimas podem ser imobilizadas por diferentes metodologias, como adsorção física, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento e ligação cruzada (Figura 1). Dentre esses métodos, a adsorção se destaca por ser um processo simples, que requer baixa energia e preserva as características naturais das enzimas (Dong *et al.*, 2024); (Patil *et al.*, 2023).

Recentemente, materiais avançados como estruturas metal-orgânicas (MOFs) têm sido amplamente investigados como suportes para imobilização enzimática. Essas estruturas possuem alta estabilidade térmica e química, além de uma porosidade ajustável, o que permite

a proteção enzimática contra condições adversas e melhora sua eficiência catalítica (Suo *et al.*, 2023). Estudos demonstram que lipases imobilizadas em MOFs exibem desempenho catalítico superior em comparação com lipases livres, devido à estabilidade estrutural dos suportes (Shi *et al.*, 2024); (Huang *et al.*, 2022).

Figura 1: Métodos de imobilização enzimática.



Fonte: Moreira, 2024 com adaptações.

O termo imobilização é amplo e refere-se ao processo de fixar uma biomolécula em um reator, um suporte ou sistema analítico (Cardozo *et al.*, 2009). No contexto enzimático, a imobilização envolve a combinação de suas propriedades seletivas, estabilidade e cinética com as propriedades físicas e químicas do substrato, gerando uma formulação especializada cujo principal objetivo é otimizar a estabilidade física e funcional do biocatalisador (Basso & Serban, 2019).

Existem diversos métodos e protocolos já foram desenvolvidos para a imobilização de enzimas. A seleção da técnica e do suporte adequado é, sobretudo, determinada pelas características físico-químicas da enzima e pelas condições operacionais às quais será submetida. Desse modo, é fundamental levar em conta o tempo e os gastos relacionados à

aplicação do método, pois esses elementos impactam diretamente a viabilidade do procedimento e o custo do produto final (Fernandes, Lima e Lopes, 2010).

2.4.1 IMOBILIZAÇÃO EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

As nanopartículas magnéticas (MNs) são capazes de serem produzidas a partir de materiais com elevada saturação magnética, tais como metais de transição (ferro, cobalto e níquel) e óxidos metálicos, como Fe_3O_4 e $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (Latha *et al.*, 2021). Apesar de metais puros, como nanopartículas de ferro, terem uma magnetização mais forte, eles são altamente tóxicos e propensos à oxidação. Por outro lado, os óxidos de ferro superparamagnéticos, materiais que, em escala nanométrica, se comportam como ímãs apenas na presença de um campo magnético externo e não retêm magnetismo após sua remoção, proporcionam maior estabilidade química e biocompatibilidade, sendo preferidos para usos biotecnológicos, mesmo com sua magnetização reduzida (Samrot *et al.*, 2020). Frequentemente, a síntese de MNs à base de óxido de ferro é realizada através de processos como coprecipitação, microemulsão, decomposição térmica e reações hidrotermais. Esses procedimentos possibilitam o gerenciamento do tamanho e da estabilidade das partículas, fundamentais para usos biotecnológicos e biomédicos (Fathallah *et al.*, 2022).

As características inerentes das MNs, como ampla superfície, resistência ao calor, interações eficazes entre enzima e substrato, além da reatividade química, as tornam perfeitas para usos em biotecnologia. No âmbito da nanotecnologia, as nanoestruturas têm se destacado como meios promissores para a imobilização de enzimas, devido às suas características exclusivas, como elevada razão superfície-volume, que proporciona maior área de contato para ancoragem da enzima, favorecendo a eficiência catalítica e a estabilidade do biocatalisador. Essas englobam dimensões reduzidas, ampla superfície, resistência a condições severas, interações eficientes entre enzima e substrato, bem como elevada reatividade química (Schemberg *et al.*, 2022). Essas propriedades têm atraído cada vez mais a atenção dos pesquisadores nos últimos anos (Oke *et al.*, 2023). Além disso, o superparamagnetismo de certas nanoestruturas possibilita a restauração do biocatalisador através da simples aplicação de um campo magnético, minimizando o estresse mecânico nas enzimas e melhorando sua estabilidade e reusabilidade (Darwesh *et al.*, 2020). O emprego de nanoflores híbridas, nanofibras e estruturas fundamentadas em nanotubos tem demonstrado potencial para

incrementar a eficiência catalítica e a estabilidade das enzimas imobilizadas, tornando-as perfeitas para usos industriais (Costa *et al.*, 2022).

São relatados na literatura diferentes métodos e suportes para imobilização de distintos tipos de enzimas em nanopartículas magnéticas, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas e suas aplicações biotecnológicas

Enzimas	Nanopartículas	Aplicações	Referências
Lipase (CALB)	Fe ₃ O ₄	Síntese de ésteres (aromas)	(Souza et al., 2017)
Lipase (Eversa® Transform 2.0)	Fe ₃ O ₄	Produção de Biodiesel	(Brandão et al, 2023)
Lipase (Eversa® Transform 2,0)	Fe ₃ O ₄	Produção de Biodiesel	(Santos et al., 2024)
Lipase (CALB)	Fe ₃ O ₄	Produção de Ésteres	(Serpa et al., 2021)
Lipase (RML)	Fe ₃ O ₄	Produção de Éster Etílico de Ácido Graxo (FAAE)	(Moreira et al., 2020)

Fonte: autoria própria

Frequentemente, modifica-se a superfície das nanopartículas com o objetivo de simplificar o processo de imobilização enzimática. Essas nanoestruturas são alteradas com componentes orgânicos, como o ácido láurico, assim como inorgânicos, como dióxido de silício ou sílica (SiO₂), com o propósito de criar partículas funcionalizadas (como um grupo amino) para serem imobilizadas por meio de processos enzimáticos (Ahangari *et al.*, 2024). Os agentes de acoplamento são frequentemente empregados para reticular covalentemente nanopartículas e enzimas magnéticas modificadas. Isso ocorre porque seus grupos têm a capacidade de interagir tanto com os grupos funcionais das nanopartículas magnéticas modificadas quanto com os grupamentos das enzimas. O glutaraldeído, cujo grupo funcional é o aldeído, é um exemplo de agente de acoplamento (Zhang *et al.*, 2021).

As nanoestruturas surgem como uma nova possibilidade aos suportes denominados de convencionais, essas possibilidades nos oferecem novas propriedades, como elevada área superficial, melhores condições, como resistência a temperatura, possuem boa reatividade química e fortes interações com as enzimas. (Guasamucare *et al.*, 2020).

Esses nanomateriais magnéticos podem ser encontrados na natureza, como por exemplo as nanopartículas magnéticas de magnetita, as quais são observadas em insetos, bactérias e até animais maiores. A magnetita é um importante minério de ferro que confere as propriedades magnéticas das rochas, muitos desses organismos utilizam esse minério para facilitar a orientação geográfica. (Mishra & Yadav, 2024); Souza, 2013).

Na nanotecnologia, as nanoestruturas surgem como uma ajuda que são alternativas para a imobilização enzimática. Propriedades com o tamanho reduzido, área de superfície alta, resistência a altas temperaturas, altas interações enzimas-substrato e alta reatividade química atraiu a atenção dos cientistas nos tempos atuais (Matysik, Długosz & Banach, 2024). Devido à propriedade do superparamagnetismo, é possível a recuperação do biocatalisador apenas por aplicação de um campo magnético, ocasionando baixo estresse mecânico as enzimas (Tan *et al.*, 2024). De acordo com a literatura, métodos e suportes variados para imobilização são utilizados em diferentes enzimas nanopartículas magnéticas. Recorrentemente, a superfície das nanopartículas sofre modificações em busca de facilitar o processo de imobilização enzimática (Wang, Fang & Yang, 2024). Essas nanoestruturas são modificadas com materiais orgânicos (por exemplo, ácido láurico) e inorgânicos (por exemplo, SiO₂) com o intuito de produzir partículas funcionalizadas (por exemplo, grupo amino) para imobilização enzimática (Wang *et al.*, 2024).

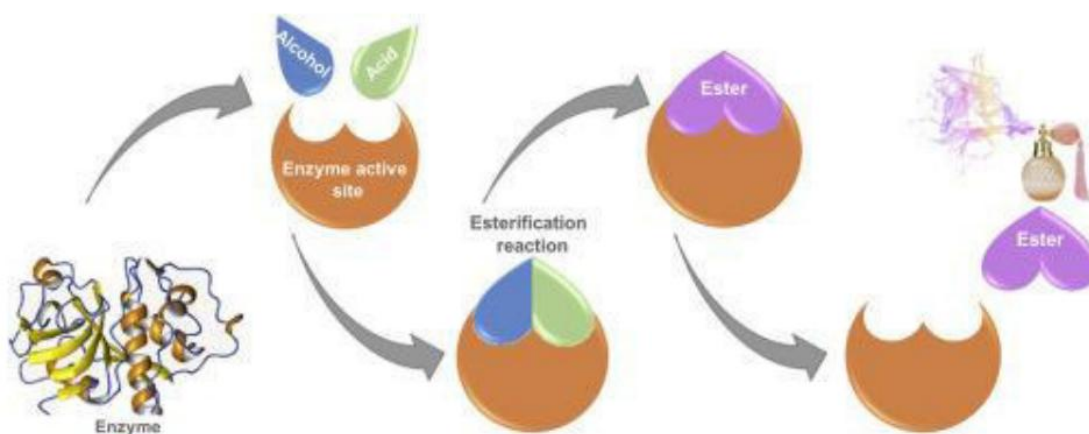
2.5 ÉSTERES

Os ésteres de ácidos graxos despertam grande interesse na indústria por estarem presentes em vários produtos, incluindo aromatizantes, perfumes, cosméticos, remédios e biocombustíveis. A produção química desses ésteres possui diversos inconvenientes, como efeitos adversos ao meio ambiente, decorrentes do uso de substâncias químicas perigosas, solventes nocivos e condições extremas de temperatura e pressão. Esses elementos tornam crucial a procura por opções mais sustentáveis, como a utilização de biocatalisadores enzimáticos (Sousa *et al.*, 2023).

Os processos químicos podem ser trabalhosos devido alguns fatores, como a ausência de seletividade dos substratos, da produção de subprodutos, do alto consumo de energia e da corrosão de equipamentos. Esses obstáculos tornam o uso de métodos químicos impróprios para a produção de produtos tidos como naturais, devido ao risco de contaminação por resíduos tóxicos. Em contrapartida, a utilização de enzimas na produção de ésteres proporciona vários benefícios, tais como maiores seletividades, condições de reação mais suaves e menor impacto no meio ambiente (Silva *et al.*, 2020). Em particular, as lipases imobilizadas têm sido extensivamente utilizadas na produção de ésteres, proporcionando maior estabilidade, reutilização e eficácia dos biocatalisadores em sistemas sem a necessidade de solventes. Essas estratégias são opções viáveis e sustentáveis para usos industriais (Facin *et al.*, 2020).

Diversas lipases foram estudadas e aplicadas na catálise da reação de esterificação, incluindo enzimas de *Candida cylindracea*, *Candida antarctica*, *Mucor miehei*, *Rhizopus arrhizus* e *Pseudomonas fluorescens* (Zhao *et al.*, 2024). Essas lipases são amplamente utilizadas devido à sua versatilidade e eficiência em reações enzimáticas para a produção de ésteres e compostos de alto valor agregado (Al Dahhan, Baghdadi & Alkattan, 2024).

Figura 2: Mecanismo da reação de esterificação catalisada por enzimas.



Fonte: SÁ et al, 2017.

Dentre as principais aplicações dessas lipases, destaca-se a produção de ésteres de cadeia curta, amplamente utilizados como aromas e sabores na indústria de alimentos e bebidas. Os ésteres como butiratos de etila e metila são essenciais para a composição de aromas de

diversas frutas, incluindo abacaxi, maracujá, morango e maçã (Suo *et al.*, 2023). A esterificação enzimática desses compostos apresenta vantagens, como alta seletividade, menor impacto ambiental e preservação de características sensoriais dos produtos finais (Ramos *et al.*, 2024).

Os ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos de cadeia longa, como oleatos, palmitatos, ricinoleatos e linolenatos, são amplamente utilizados em diversas aplicações industriais, incluindo a produção de biolubrificantes, surfactantes e fragrâncias naturais (Nguyen *et al.*, 2023). Esses ésteres possuem características desejáveis, como biodegradabilidade, baixa toxicidade e alta estabilidade química, tornando-os alternativas viáveis aos compostos sintéticos derivados do petróleo (Li *et al.*, 2024). Além disso, métodos inovadores, como a esterificação assistida por micro-ondas e o uso de enzimas imobilizadas, vêm demonstrando alta eficiência na conversão de ácidos graxos em ésteres, reduzindo o tempo de reação e o consumo energético (Brandão Júnior *et al.*, 2023).

3 METODOLOGIA

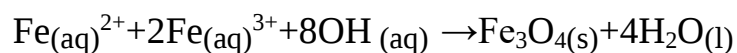
O objetivo deste trabalho é realizar um estudo experimental sobre o sistema de imobilização enzimática, para determinar a melhor metodologia de imobilização. Para isso, será avaliada a produção de nanopartículas magnéticas (MNs) e, posteriormente, a imobilização de lipase Eversa® Transform 2.0 nessas partículas, ajustando a metodologia. A metodologia proposta inclui a caracterização das nanopartículas e do biocatalisador imobilizado por técnicas, como Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Termogravimetria (TG) e Difração de Raios X (DRX). Além disso, a imobilização da lipase será otimizada considerando variáveis como concentração de proteína, tipo de suporte e tempo de reação, visando maior eficiência catalítica e durabilidade do biocatalisador.

3.1 MATERIAIS E MÉTODOS

As nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) foram produzidas pelo método de coprecipitação (Barreto *et al.*, 2012) com adaptações. A lipase de Eversa® Transform 2.0 foi adquirida da Novozymes S/A (Dinamarca). O γ -aminopropiltriétoxissilano (APTES), solução de glutaraldeído grau II 25% (m/v), butirato de p-nitrofenila (pNPB) e p-nitrofenila (pNP) foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os demais reagentes de grau analítico foram obtidos da Distribuidora Cequímica (Fortaleza, Brasil).

3.2.1 Síntese de nanopartículas de magnetita

A síntese de nanopartículas magnéticas foi realizada de acordo com Barreto et al. (2012), com adaptações. Sais metálicos contendo Fe^{2+} e Fe^{3+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em água destilada na razão molar de 1:2, respectivamente. A solução foi ajustada para pH 3 usando HCl 5% (v/v) e aquecida a 80°C sob agitação de 1200 rpm durante 30 min., em seguida foi adicionado 30 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH) por um gotejamento ainda em aquecimento e agitação por 30 min, sendo formado um precipitado preto, conforme reação abaixo:



O precipitado foi lavado algumas vezes com água destilada até a solução residual atingisse a neutralidade, seguida de uma única lavagem com etanol. Finalmente, as nanopartículas magnéticas foram secas e armazenadas em dessecador, semelhante ao processo realizado por Souza (2013). O suporte foi denominado MNs.

3.3 Tratamento do suporte com γ -aminopropiltriétoxissilano (APTS)

A reação foi iniciada com a adição das nanopartículas magnéticas em 120 mL de etanol (95%). A seguir, o material foi submetido a ultrassom durante 1 hora. Após esse período, adicionou-se 10 mL de APTS, mantendo-se a mistura sob ultrassom por mais 1 hora. O material precipitado foi lavado com etanol com o auxílio de um ímã e, em seguida, levado para dessecador, conforme descrito por Souza (2013) em seu estudo. O material resultante foi denominado MNs_APTS.

3.4 Reticulação com solução de glutaraldeído (GLU)

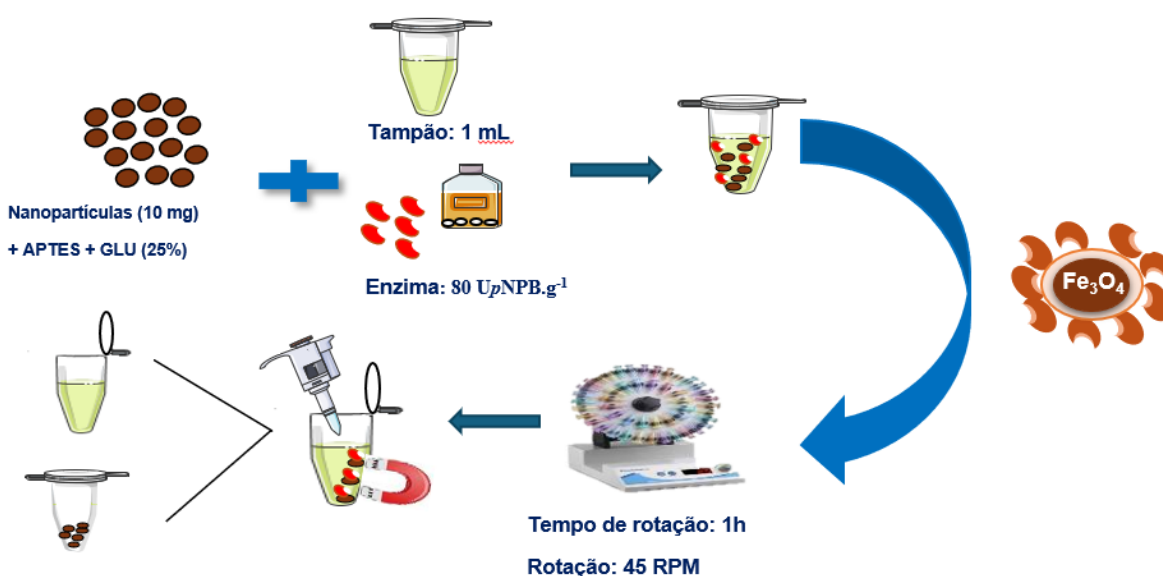
As nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 foram funcionalizadas utilizando glutaraldeído (GLU) a 25% (p/v), seguindo a metodologia descrita por Souza et al. (2017). Para o procedimento, 25 μL de glutaraldeído foram adicionados a 0,01 g de nanopartículas de magnetita. A mistura foi submetida à agitação constante por 2 horas a 25°C . Após esse período, os suportes foram lavados três vezes com tampão fosfato de sódio $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7) para

remover o excesso de glutaraldeído, conforme mencionado no estudo de Souza (2013). O suporte funcionalizado resultante foi denominado MNs_APTS_GLU.

3.5 Imobilização Enzimática

O processo de imobilização foi realizado utilizando nanopartículas magnéticas previamente tratadas com APTS e reticuladas com glutaraldeído. As nanopartículas foram suspensas em uma solução de tampão fosfato de sódio, à qual foi adicionada a enzima Eversa® Transform 2.0. A mistura permaneceu sob agitação controlada para permitir a imobilização da enzima no suporte de nanopartículas. Após o processo, as nanopartículas funcionalizadas foram separadas da solução utilizando um campo magnético externo. Para o experimento, foram utilizados 0,01 g de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4), adicionados a 1 mL de solução de tampão fosfato de sódio ($5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7,0). Em seguida, $80 \text{ UpNPB} \cdot \text{g}^{-1}$ de enzima Eversa® líquida foram incorporadas ao sistema, mantendo a 25°C sob agitação de 45 rpm durante 1 hora. Após esse período, a enzima imobilizada foi recuperada da solução por meio de separação magnética e o material foi denominado MNs_APTS_GLU_EV. A capacidade de imobilização do novo biocatalisador foi avaliada.

Figura 3: Esquema do processo de imobilização enzimática.



Fonte: Moreira, 2025.

3.6 Síntese e Cinética do biocatalisador

A produção de ésteres por reação de esterificação foi composta de 1 mL de solvente (hexano) como meio reacional, ácido butírico e os álcoois (metanol e etanol) em diferentes concentrações e razão molar (1:3 – 1:5). O biocatalisador foi adicionado a uma atividade específica (80U.g⁻¹). A reação foi conduzida sob agitação orbital (150 rpm) a 25 °C, com a melhor condição reacional utilizada com a Eversa® Transform 2.0 imobilizada. Em eppendorfs de 2mL foram adicionados 0,01g de nanopartícula magnética + Eversa® + 1mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7). Após a imobilização em 1 hora e em 45rpm, os tubos foram lavados com 1mL de tampão fosfato de sódio 5 mmol.L⁻¹ (pH 7), deixando apenas o derivado (suporte + enzima). O procedimento de esterificação foi realizado, inicialmente mantendo o padrão do melhor resultado descrito por Souza (2013). Nos eppendorfs contendo o derivado (suporte + enzima), foram adicionados 1mL do meio reacional composto por hexano, ácido butírico e os álcoois (etanol ou metanol) em diferentes concentrações (0,2 mol/L; 0,4 mol/L; 0,6 mol/L; 0,8 mol/L e 1,0 mol/L) e razões molares (1:1 – 1:5).

A reação foi conduzida sob diferentes tempos de ocorrência (4, 6, 8, 10 e 12 horas), à temperatura de 25 °C e em agitação orbital 150 rpm. Após as reações de esterificação concluídas, as amostras foram analisadas em triplicatas em frascos de Erlenmeyer com 0,5g da amostra (butirato de etila/ butirato de metila), com 25mL de álcool comercial neutralizado e duas gotas de fenolftaleína como indicador. Cada amostra foi titulada com a solução de KOH 0,1 mmol.L⁻¹ até a modificação da cor para um rosa suave. Finalizado as titulações, os volumes totais consumidos foram utilizados na descoberta para a obtenção do índice de acidez (IA), onde **MNaOH**: Massa molar do NaOH (hidróxido de sódio), **MM_{NaOH}**: Molaridade da solução de NaOH (mol/L), **fV_{NaOH}**: Volume da solução de NaOH gasto na titulação, **m**: Massa da amostra analisada, em gramas (g), analisado pelo método 5-40 AOCS (Mossoba, 2010). A melhor condição foi aplicada para fins de análises dos ciclos de reutilização do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV.

$$IA = \left(\frac{mgNaOH}{g} \right) = \frac{MM_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot fV_{NaOH}}{m} \quad \text{Equação (1)}$$

3.7 Reuso do biocatalisador

A avaliação da estabilidade operacional foi realizada por meio de reações consecutivas para a síntese dos ésteres butirato de metila e o butirato de etila, utilizando 80 U.g⁻¹ de Eversa® -MNs. Após cada ciclo de reação, as nanopartículas magnéticas contendo a enzima imobilizada (MNs_APTS_GLU_EV) foram separadas facilmente usando um campo magnético (ímã). Em seguida, as partículas foram lavadas com hexano para remover os produtos formados e os substratos que não reagiram, permitindo o uso do biocatalisador nos ciclos seguintes. Após os procedimentos de esterificação, os biocatalisadores recuperados, contendo a enzima Eversa® Transform 2.0 imobilizada, foram cuidadosamente separados dos ésteres sintetizados (butirato de metila e butirato de etila). Os procedimentos foram realizados semelhantes aos estudos de Bizerra (2024).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas e biocatalisadores

Os três suportes MNs, MNs_APTS, MNs_APTS_GLU, juntamente com o biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV produzidos, foram caracterizados por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Análise termogravimétrica (TG) e Difração de raios-X (DRX).

Os parâmetros analisados nesta pesquisa foram definidos baseados nos melhores resultados do estudo de Sousa *et al.*, (2013) e Bizerra (2024), considerando pH 7, temperatura de 25 °C e 150 RPM. A lipase derivada de *Aspergillus oryzae* (Eversa® Transform 2.0) foi utilizada em um suporte magnético. Esse suporte forneceu uma matriz eficiente para a imobilização da enzima melhorando sua estabilidade e facilitando a reutilização do mesmo.

A aplicação da lipase imobilizada possibilitou a catálise na produção de dois ésteres, butirato de etila e metila, amplamente utilizados como aromatizantes em indústrias alimentícias e químicas. A imobilização enzimática resultou em um aumento significativo da eficiência catalítica e a reusabilidade da enzima, tornando-a uma solução sustentável para processos industriais (Júnior *et al.*, 2023; Miranda *et al.*, 2020).

4.1.1 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A presença de grupos funcionais pode ser confirmada pela técnica da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). A Figura 4 mostra os espectros de FTIR dos materiais avaliados e sintetizados das amostras MNs, MNs_APTS, MNs_APTS_GLU e MNs_APTS_GLU_EV, confirmando os grupos funcionais formados durante os processos de funcionalização do APTS e do GLU, assim como os mecanismos de ligação da enzima imobilizada Eversa® Transform 2.0.

O espectro da magnetita (Figura 4(a)) mostra uma banda suave em 3437 cm^{-1} , que pode ser atribuída à vibração de alongamento das terminações aromáticas e alifáticas (-OH) e à água absorvida pela amostra (Brazil *et al.*, 2018; Serpa *et al.*, 2021 e Santos *et al.*, 2024).

A banda 562 cm^{-1} é localizada em todas as amostras (Figura 4(a), 4(b), 4(c) e 4(d)), confirmando a presença de modos vibracionais Fe-O. Essa banda está relacionada ao alongamento das ligações espinélio de ferro no sítio tetraédrico Fe (Petcharoen e Sirivat, 2012; Costa *et al.*, 2016).

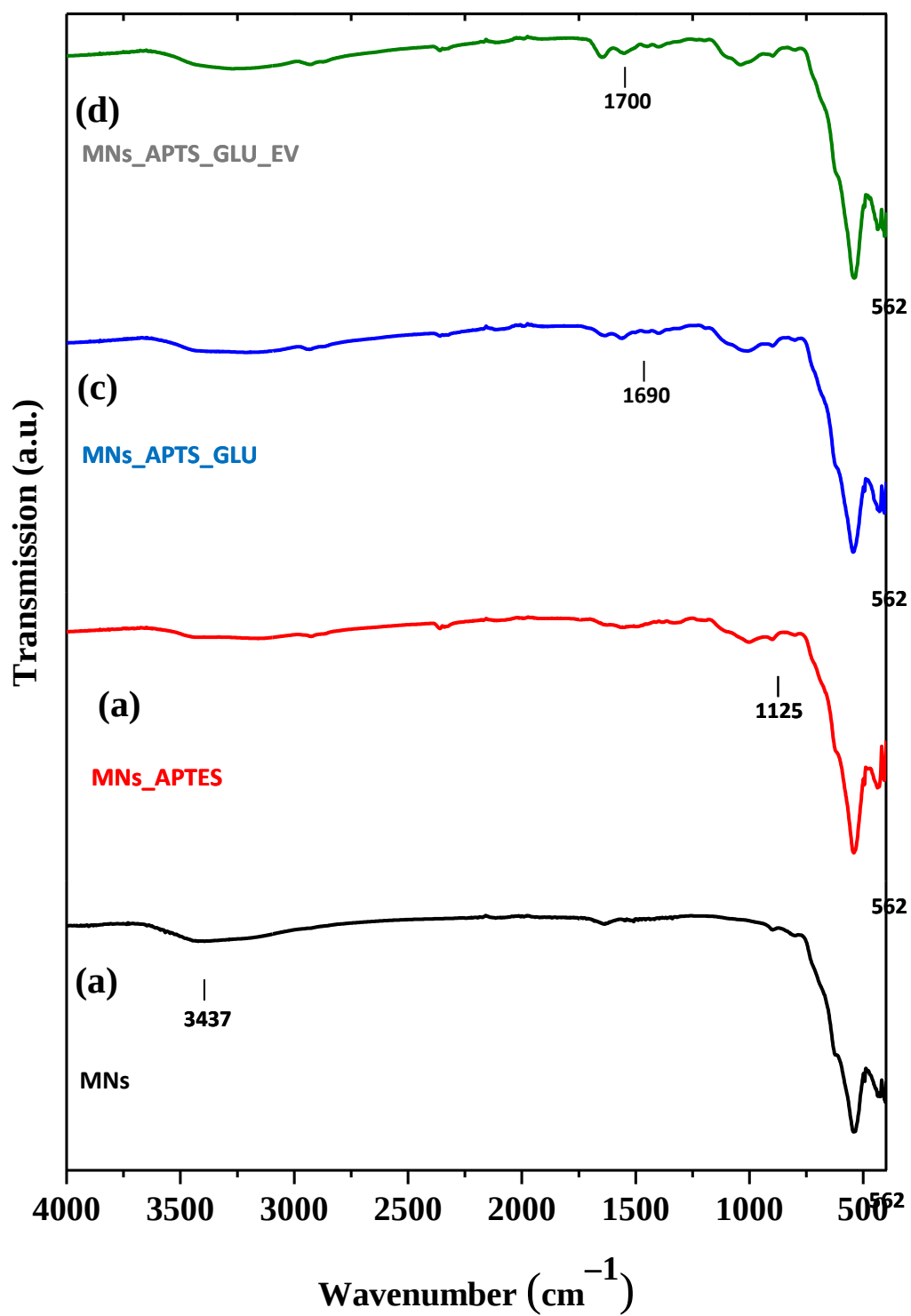
A Figura 4(b) mostra a banda 1125 cm^{-1} , e é atribuída às ligações Fe-Si correspondendo a hipótese apresentada para o padrão de difração MNs_APTS, indicando um revestimento de superfície de nanopartículas de ferro após a etapa de funcionalização com APTS (Valenzuela *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2016; Santos *et al.*, 2024).

A ativação do compósito MNs_APTS com glutaraldeído (MNs_APTS_GLU) também foi investigada através de FTIR e o resultado é exibido na Figura 4(c). Este processo não alterou a banda característica da magnetita na estrutura, mas revelou um novo pico em 1690 cm^{-1} , relacionado à vibração de estiramento do grupo carbonila (CO=) da molécula de aldeído, o que indica que o processo de ativação do suporte com moléculas de glutaraldeído foi realizado com sucesso (Yu *et al.*, 2020; Serpa *et al.*, 2021 e Santos *et al.*, 2024).

Na Figura 4(d) é possível observar que a banda em 1700 cm^{-1} apresentou um aumento bem significativo, provavelmente devido a ligação do grupo aldeído do glutaraldeído ao grupo amina da enzima que foi adicionado ao meio reacional.

Figura 4 - Espectros de FTIR das amostras: (a) MNs - nanopartículas magnéticas; (b) MNs_APTS - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS; (c) MNs_APTS_GLU -

nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído; (d) **MNs_APTS_GLU_EV** - e nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®.



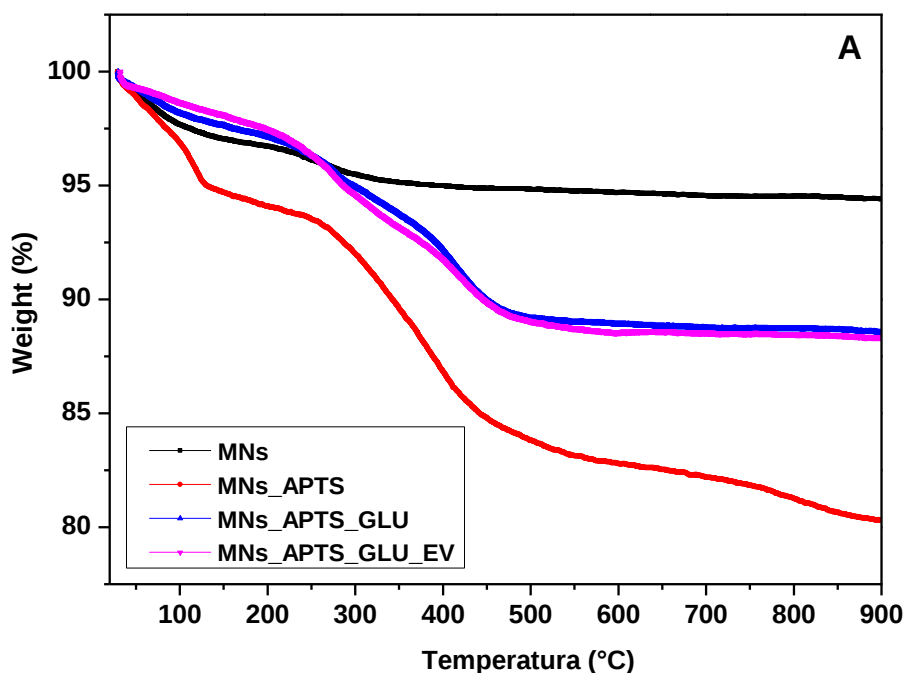
Fonte: próprio autor, 2025.

4.1.2 Análise termogravimétrica (TG)

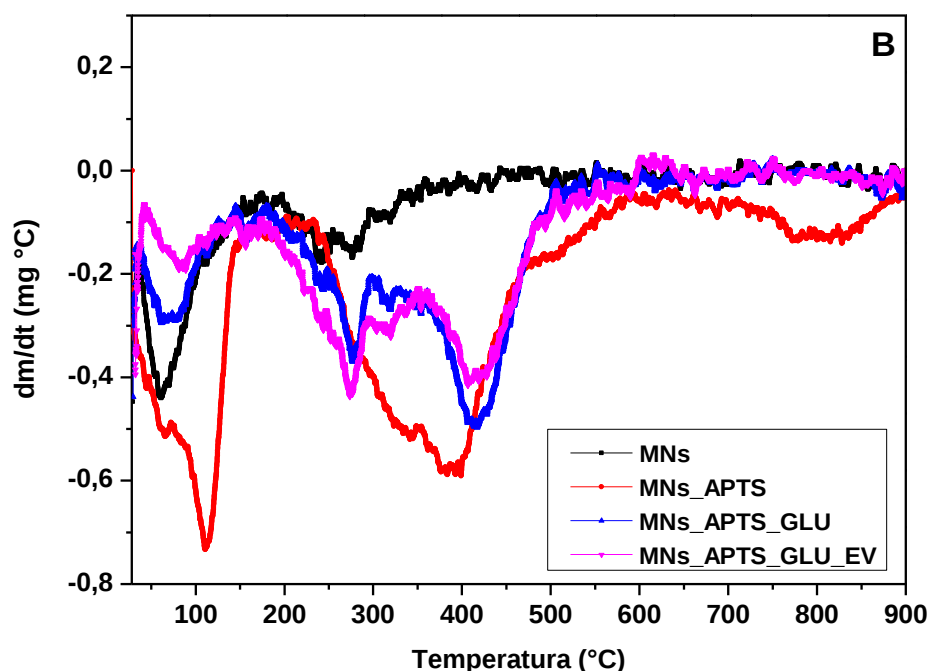
Uma análise termogravimétrica (TG) foi realizada para investigar a estabilidade térmica do suporte sintetizado e, sequencialmente, seu uso como suporte para imobilização da enzima. A Figura 5(a) mostra as curvas termogravimétricas (TG), respectivamente, para os materiais MNs, MNs_APTS, MNs_APTS_GLU e MNs_APTS_GLU_EV, evidenciando as variações de perda de massa (%) destas amostras quando expostas ao aquecimento em até 900 °C.

Na curva TG para as MNs, em que contém apenas magnetita pura, observa-se uma perda de massa mais gradual ao longo da faixa da temperatura em comparação com as outras amostras. As perdas observadas no primeiro estágio estão relacionadas à evaporação gradual da água, ocorrendo em temperaturas abaixo de 100 °C (Lee *et al.*, 2021).

Figura 5 - Curvas termogravimétricas para (A) e (B): **MNs** - nanopartículas magnéticas; **MNs_APTS** - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS; **MNs_APTS_GLU** - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído e **MNs_APTS_GLU_EV** - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a enzima Eversa® Transform 2.0.



Fonte: próprio autor, 2025.



Fonte: próprio autor, 2025.

As amostras MNs_APTS_GLU e o biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV exibiram a melhor estabilidade térmica em até 250 $^\circ C$ em todo o processo, além de uma diminuição da perda de massa em relação as nanopartículas funcionalizadas com APTS (MNs_APTS), o que demonstra a eficiência da ligação bem-sucedida de precursores como o glutaraldeído e a enzima, conferindo maior estabilidade ao sistema proposto.

Esses resultados indicam que as nanopartículas magnéticas possuem alta resistência à temperatura, assim como o biocatalisador, sendo que esse último possui uma diferença de apenas 5 % de decaimento em relação as MNs. Esse é um resultado importante, pois a estabilidade térmica é um dos fatores que determinam a aplicação do biocatalisador (Palomo *et al.*, 2002) e depende da estratégia usada durante a imobilização (Palomo *et al.*, 2002; Manoel *et al.*, 2015).

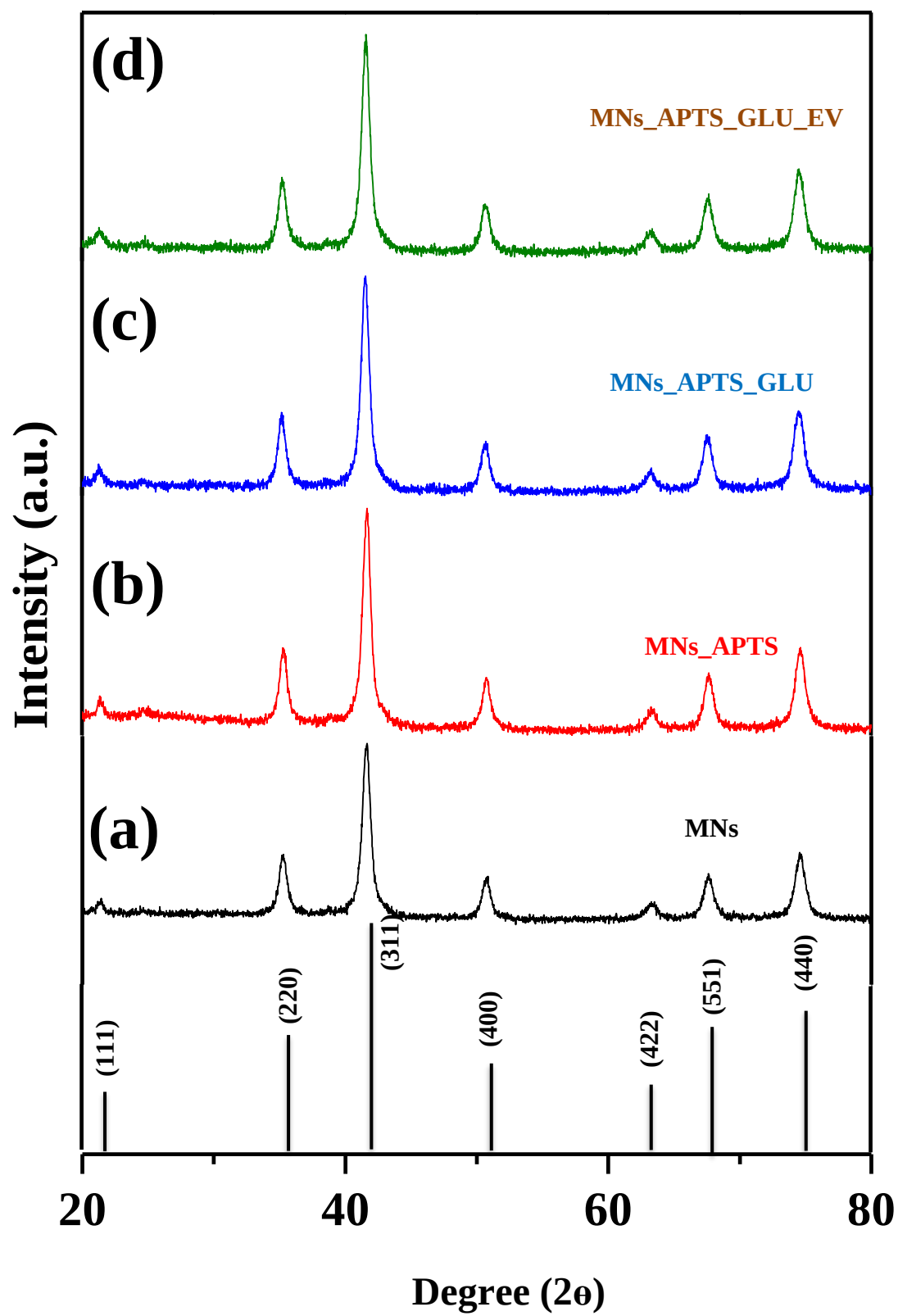
4.1.3 Difração de Raios X (DRX)

O experimento de difração de raios X (DRX) em pó foi usado para confirmar a existência de MNs de óxido de ferro. A Figura 6 mostra os perfis de DRX, usados para

determinar os parâmetros estruturais e identificar a formação da fase cristalina dos suportes usados no processo de imobilização (MNs, MNs_APTS e MNs_APTS_GLU) e do biocatalisador (MNs_APTS_GLU_EV). Os picos cristalográficos e seus respectivos índices de Miller obtidos para todas as amostras, foram: 21.5° (111), 35° (220), 41.6 ° (311), 50.7° (400) 63.2° (422), 67.2 ° (511) e 74.2 ° (440).

É importante ressaltar que a estratégia utilizada para sintetizar nanocompósitos magnéticos foi eficiente, e que o revestimento com APTS pode atuar com sucesso como um agente protetor contra a oxidação da magnetita, além de fornecer grupos funcionais utilizados para imobilizar a lipase Eversa® Transform 2.0. Os dados indicaram um sistema cristalino cúbico Fd-3m (227), com características similares às células unitárias do espinélio de magnetita (Feng *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2016), comprovando que os materiais sintetizados neste estudo são nanopartículas de Fe₃O₄. O crescimento do cristalito após a funcionalização é atribuído à presença do glutaraldeído e, após o processo de imobilização, está ligado à presença da enzima Eversa® no biocatalisador (Pashangeh *et al.*, 2017).

Figura 6 - Perfis DRX dos suportes biocatalizadores: (a) **MNs** - nanopartículas magnéticas; (b) **MNs_APTS** - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS; (c) **MNs_APTS_GLU** - nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e ativadas com glutaraldeído; (d) **MN_APTS_GLU_EV** - e nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS e GLU e imobilizada com a Eversa®.



Fonte: próprio autor, 2025.

4.1.4 Efeito do tempo de contato.

O perfil de tempo de conversão é apresentado na Figura 7 e foi realizado de acordo com metodologia utilizada por Souza *et al.* (2013). O gráfico apresenta os dados de conversão do ácido butírico em ésteres ao longo do tempo (4, 6, 8, 10 e 12 horas de reação). Como mostrado na figura 7, a conversão do ácido butírico é maior quando se utiliza metanol como reagente, alcançando um pico próximo de 85% em 10 horas, seguido de uma leve queda na última medição (12 horas). Para o butirato de etila, a conversão é relativamente estável ao longo do tempo, com sua maior conversão em torno de 80,4 % em 8 h de reação, e um comportamento mais estável em torno de 80%.

Esses resultados sugerem que a reação de esterificação com metanol é mais eficiente sob as condições experimentais aplicadas uma vez que para ambos os ésteres, a conversão aumenta progressivamente até cerca de 10 horas, momento em que o butirato de metila atinge seu ponto máximo como já citado. Após esse período, ocorre uma leve queda para o butirato de metila, o que pode indicar alguma inibição enzimática, degradação do éster ou efeito da saturação do substrato (Kumar *et al.*, 2016).

A produção de aromas por meio da síntese de ésteres etílicos e metílicos utilizando enzimas imobilizadas em nanopartículas magnéticas tem se mostrado uma abordagem promissora na biotecnologia (Almeida, 2017).

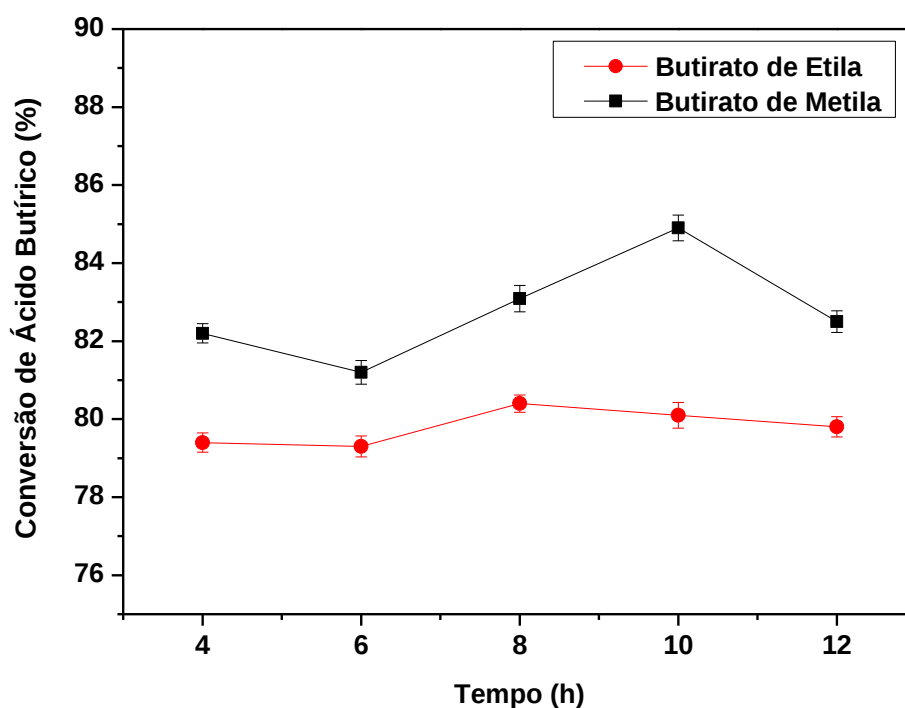
A análise em relação ao tempo permite uma avaliação do desempenho da enzima conforme a reação avança, resultando assim no tempo mínimo necessário para a conversão. Estudos recentes indicam que as reações de esterificação e o efeito do tempo estão diretamente relacionados a fatores como temperatura, imobilização enzimática para a formação de ésteres e metodologias aplicadas para otimização do processo (Curie *et al.*, 2024; Bizerra, 2024).

Na pesquisa de Melo *et al.*, (2023), o uso de lipases mostrou um desempenho aprimorado na síntese de ésteres sob aquecimento, reduzindo o tempo de reação de 24 horas para apenas 25 minutos, e a produtividade aumentou em 33 vezes (Melo *et al.*, 2023). Este resultado evidencia que a otimização das condições de reação pode reduzir significativamente o tempo necessário para uma conversão eficiente.

Miguel Júnior *et al.*, (2022) analisou a síntese de ésteres catalisada por lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas. O estudo demonstrou que quando usados como

biocatalisadores das reações alvo, os maiores valores percentuais de conversão (entre 65% e 85% de conversão ácida após 60–90 min de reação) foram alcançados para reações de esterificação catalisadas por lipase imobilizada.

Figura 7: Efeito do tempo de reação na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●). As reações foram conduzidas através do biocatalisador **MNs_APTS_GLU_EV** (Carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹), a 25 °C, 150 rpm, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, nos períodos de 4, 6, 8, 10 e 12 horas de reação. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano).



Fonte: próprio autor, 2025.

Já no estudo de Silva *et al.*, (2025) sobre a síntese de ésteres etílicos catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em nanopartículas magnéticas, os resultados da conversão foram de 60% em 24 h de reação.

E estudos realizados por Souza et al., (2013) relatam conversão máxima para butirato de metila de 93,9% e butirato de etila de 96,8% foram obtidos após 8 h de reação a 25 °C para a enzima CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas.

É possível identificar que as conversões levaram tempos variados para atingir uma taxa de conversão elevada, isto se deve a diversos fatores, como o suporte a qual foram imobilizadas, as concentrações adequadas de enzima e substratos, os solventes utilizados e dentre outros. Esses resultados reforçam a importância da imobilização enzimática na melhora do desempenho catalítico.

A imobilização da lipase Eversa[®] Transform 2.0 em suportes magnéticos facilita a recuperação e reutilização do biocatalisador, além de potencialmente aumentar sua estabilidade e atividade catalítica. Os resultados deste estudo do tempo reacional demonstraram bom desempenho. Ao mesmo tempo que comparado aos estudos anteriores, a conversão foi satisfatória mesmo sob condições brandas, com um tempo de apenas 8 e 10 horas, em temperatura de 25 °C, em conformidade com os dados da literatura.

4.1.5 Estabilidade operacional

Uma das vantagens mais significativas do uso de um catalisador heterogêneo é sua reutilização. A imobilização facilita a reutilização do catalisador e melhora a estabilidade da enzima, oferecendo uma vantagem adicional. A reutilização do biocatalisador foi avaliada pela realização de ciclos consecutivos, em que após cada ciclo, o material foi submetido a uma lavagem com hexano e reutilizado novamente com as mesmas condições em cada ciclo (Silva *et al.*, 2025).

A estabilidade operacional foi avaliada em 14 ciclos consecutivos de 8 horas, como representado na Figura 8. Os parâmetros utilizados nesse estudo foram razão molar, temperatura e velocidade de agitação, baseados nas metodologias realizadas por Souza *et al.* (2023), Moreira *et al.* (2024) e Bizerra (2024).

A análise da estabilidade operacional se deu com a reutilização do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV, seguindo as melhores condições de tempo reacional: 8 horas de reação para o butirato de etila e 10 h para o butirato de metila, a 25°C, em 150 rpm, nas concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila,

utilizando hexano como solvente e um volume reacional de 1mL (ácido butírico, metanol/etanol e hexano).

A conversão máxima de ambos os ésteres ocorreu logo no início do estudo, em que a produção de butirato de metila foi de 85,8 % no 1º ciclo, e a maior produção de butirato de etila foi de 86,4% também no início do ciclo.

Souza *et al.*, (2013) fez estudos da reutilização para dois catalisadores, CALB imobilizada em nanopartículas magnéticas e a enzima comercial (Novozym® 435) para fins de comparação. A primeira reteve 76% de sua atividade inicial após 12 ciclos, enquanto a Novozym® 435 reteve 79%.

No trabalho de Moreira *et al.*, (2024) foi feito um estudo de reuso em 14 ciclos consecutivos usando a enzima utilizando enzima Eversa® Transform 2.0. No 4º ciclo a conversão se manteve em torno de 80% e a partir do 5º ciclo o valor da conversão foi diminuindo, variando de 77% a 39,9%.

Brandão Junior *et al.* (2023) realizaram um estudo semelhante, em 3 ciclos de 8 horas com os óleos de babaçu e tucumã, obtendo uma conversão de ésteres de 82,2% e 86%, respectivamente, utilizando enzima Eversa® Transform 2.0 em nanopartículas magnéticas. De modo geral, o biocatalisador apresentou uma diminuição da atividade catalítica após os 3 ciclos.

Neste trabalho, como mostrado na Figura 8, a maior queda observada da conversão foi de 81,23 %, para ambos os ésteres no 13º ciclo, o que demonstra ser um valor bem relevante, comparando com os autores mencionados anteriormente, provando que o biocatalisador usado (MNs_APTS_GLU_EV) é favorável, suportando longos ciclos de reuso, não ocorrendo alterações significativas nos demais ciclos, variando entre 82% a 85%.

Júnior *et al.*, (2022) estudaram vários ésteres de sabor por meio da esterificação do ácido octanoico com diferentes álcoois comerciais de cadeia curta (metanol, propanol, álcool, álcool benzílico) em sistemas livres de solventes usando a Lipase Eversa® Transform 2.0 imobilizada. A reutilização da lipase imobilizada após seis reações consecutivas de esterificação em lote foi investigada. As conversões atingiram em torno de 80% e após os 6 ciclos ficaram em torno de 5%.

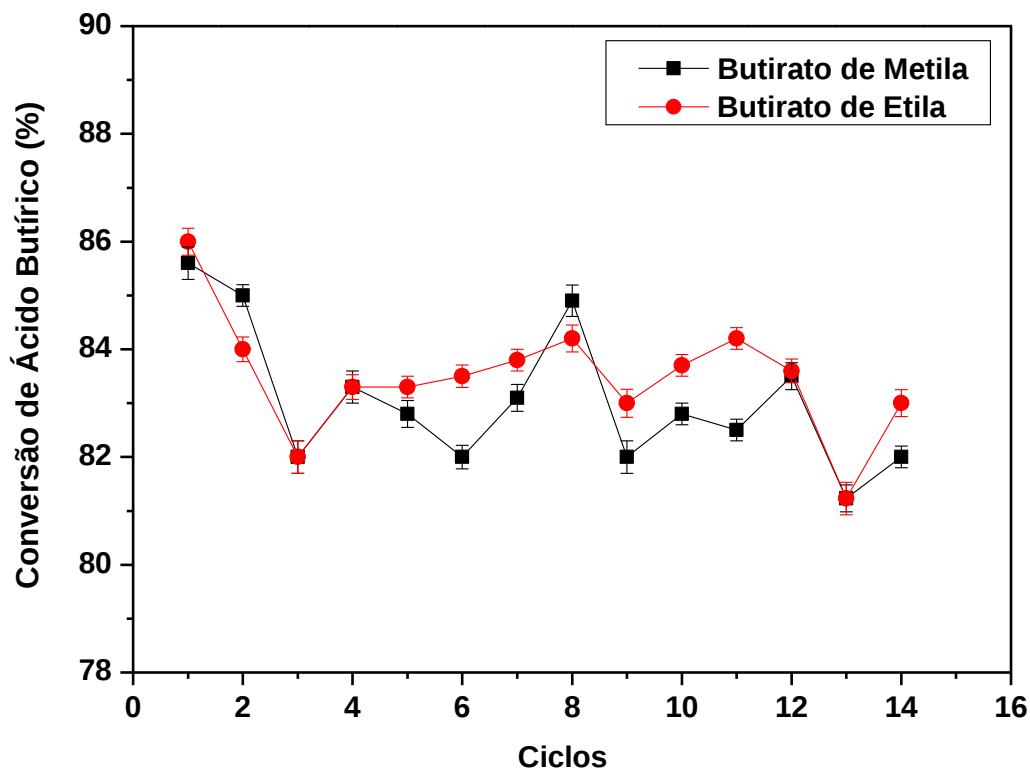
A diminuição do desempenho da reutilização de um biocatalisador pode ser atribuída à desativação/desnaturação da enzima pela temperatura, solventes, substrato, produtos, agitação mecânica, agregação da enzima, perda de quantidade de biocatalisador devido à sua manipulação e solvente de lavagem (Silva *et al.*, 2025). A reação de esterificação gera água

como subproduto, e o aumento da quantidade de água formada, além de favorecer a reação reversa (hidrólise do éster), pode se acumular no suporte do biocatalisador, limitando a solubilidade do substrato hidrofóbico e criando uma barreira de difusão ao redor da molécula da enzima (Rios *et al.*, 2022).

Esse reuso só é viável quando as enzimas são imobilizadas, possibilitando sua ativação por longos períodos, mesmo sendo sensíveis a mudanças no ambiente. A imobilização preserva as enzimas de condições desfavoráveis, como mudanças extremas de temperatura e pH, favorecendo usos industriais. Além disso, essa abordagem é considerada economicamente viável e ecologicamente correta (Maghraby *et al.*, 2023).

As limpezas realizadas com hexano no biocatalisador ajudam a eliminar o excesso de substrato ou produtos que se encontram no seu interior. Quando essa remoção não é eficiente, ou quando a lavagem é feita somente com água destilada, a inativação da enzima pode ser acelerada, tendo maior probabilidade de acontecer (Basso & Serban, 2020). No estudo, o hexano foi empregado ao longo de todo o ciclo de análise operacional, tanto como solvente (juntamente com ácido butírico, etanol, metanol e MNs_APTS_GLU_EV), quanto nas lavagens entre os ciclos.

Figura 8: Estabilidade operacional na síntese de conversão dos ésteres butirato de metila (■) e butirato de etila (●) . As reações foram conduzidas através do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV, carga enzimática: 80 UpNPB.g⁻¹, temperatura 25 °C, 150 rpm, concentrações molares de 0,2 mol/L, razão molar de 1:5 para butirato de metila e 1:3 para butirato de etila, no período de 8 horas. Volume reacional de 1,0 mL (ácido butírico; (metanol/etanol); hexano).



Fonte: próprio autor, 2025.

Pesquisas recentes destacam a importância de imobilizar lipases para aprimorar a estabilidade e a reutilização do biocatalisador. Bullo *et al.* (2024) analisaram a eficácia da lipase Eversa[®] Transform 2.0 na produção de biodiesel, comparando-a com a Novozym[®] 435, ressaltando a viabilidade econômica do biocatalisador imobilizado para usos industriais (Bullo *et al.*, 2024). Ademais, Hussain *et al.* (2023) debatem várias técnicas de imobilização de lipases e sua relevância para áreas como a de alimentos, cosméticos e farmacêuticas (Hussain *et al.*, 2023).

A imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas é uma estratégia eficaz para a produção de ésteres aromáticos, pois facilita a recuperação do biocatalisador e potencialmente melhorando sua estabilidade e atividade catalítica. Os resultados experimentais discutidos, juntamente com estudos correlatos, indicam que a escolha do álcool (metanol ou etanol) e as condições reacionais são cruciais para otimizar a conversão e a eficiência do processo.

5 CONCLUSÃO

A esterificação do ácido butírico com metanol e etanol, na presença do biocatalisador magnético com a enzima Eversa Transform 2.0 foi efetivada com sucesso. Os resultados apresentados neste trabalho auxiliaram nas discussões e na análise final das conclusões. As nanopartículas magnéticas (MNs) modificadas com APTES e GLU proporcionam um suporte resistente para a enzima ativa, possibilitando a preservação de sua atividade catalítica durante vários ciclos reacionais. A cobertura com APTES ajuda na proteção contra a oxidação e a formação de agregados das nanopartículas, otimizando a interação com os grupos aldeídos do glutaraldeído e assegurando maior estabilidade enzimática. O biocatalisador (MNs_APTS_GLU_EV) avaliado neste trabalho apresentou boa eficiência na síntese de butirato de etila e metila, alcançando conversões acima de 80% na ocorrência entre ácido butírico e etanol sob as condições ideais de 8 a 10 h horas, a 25 °C e 150 rpm . Além disso, a estabilidade operacional evidenciada nos ciclos torna visível o potencial de MNs_APTS_GLU_EV como um biocatalisador sustentável, uma vez que pode ser facilmente separado e recuperado por meio da aplicação de um campo magnético. Diante dos resultados identificados, é enfatizando que o uso do biocatalisador MNs_APTS_GLU_EV é bastante eficaz para a produção dos ésteres butirato de metila e butirato de etila, sendo vantajoso para indústrias com excelente custo benefício, sendo acessível e ecologicamente correto.

6 REFERÊNCIAS

ABDALLAH R. I., KWANG-HYUN, B. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 163, 2020, Pages 1624-1639, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32916199/>. Acesso em: 02 dez. 2024.

ALCÁNTARA, A., DE MARÍA, D., LITTLECHILD, J., SCHÜRMANN, M., SHELDON, R., WOHLGEMUTH, R. Biocatalysis as Key to Sustainable Industrial Chemistry. 2022, **ChemSusChem**. <https://doi.org/10.1002/cssc.202102709>. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cssc.202102709>. Acesso em: 05 dez. 2024.

ALMEIDA, C, S et al. Melhorando a imobilização de lipase por meio de adsorção física: avanços em estabilidade, reutilização e aplicações industriais para processos biotecnológicos sustentáveis. **ACS Omega**, v. 9, n. 47, p. 46698-46732, 2024. DOI: 10.1021/ACSOMEGA.4C07088. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acsomega.4c07088>. Acesso em: 05 dez. 2024.

ALMEIDA SÁ, A.G. A., MENESES, A. C., ARAÚJO, P. H. H., OLIVEIRA, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science & Technology**. V. 69, p. 95-105, 2017. DOI: 10.1016/j.tifs.2017.09.004. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319953062_A_review_on_enzymatic_synthesis_of_aromatic_esters_used_as_flavor_ingredients_for_food_cosmetics_and_pharmaceuticals_industries. Acesso em: 02 dez. 2024.

ANDRADE SOUZA. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte, *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria* - Vol. 4, 2017, Pages 529-568, <http://dx.doi.org/10.5151/5566-15>. Disponível em: <https://openaccess.blucher.com.br/article-details/imobilizacao-enzimatica-principios-fundamentais-e-tipos-de-suporte-20266/>. Acesso em: 02 dez. 2024.

ANGLI, C. C., DIANURSANTI, B. W., GOZAN, M. (2024). Titration vs. GC-MS Analysis to Determine the Factors Affecting the Esterification Activity of *Candida rugosa* Lipase Immobilized onto Celite. **E3S Web of Conferences**, 503. <https://doi.org/10.1051/e3sconf/202450301003>. Disponível em: https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/abs/2024/33/e3sconf_isac-iccme2023_01003/e3sconf_isac-iccme2023_01003.html . Acesso em: 02 dez. 2024.

AHANGARI, H., MAJDI, H., NAZARI, M., HAMISHEHKAR, H., EHSANI, A., MINAMI, T. Preparação de nanopartículas de ouro em um único recipiente usando glutaraldeído como um agente redutor e estabilizador para imobilização de proteínas. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v. 15, 2024. DOI: 10.1088/2043-6262/ad4bac. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/381243030_One-pot_and_facile_preparation_of_gold_nanoparticles_using_glutaraldehyde_as_a_reducing_and_stabilising_agent_for_protein_immobilisation. Acesso em: 02 dez. 2024.

BASSO, A., SERBAN, S. Overview of immobilized enzymes' applications in pharmaceutical, chemical, and food industry. **Methods in Molecular Biology**, v. 2100, p. 27-63, 2020. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0215-7_2. Acesso em: 05 dez. 2024

BASSO, A., SERBAN, S. Aplicações industriais de enzimas imobilizadas: Uma revisão. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, 2019.

WILTSCHI, B., CERNAVA, T., DENNIG, A., GALINDO CASAS, M., GEIER, M., Gruber, S., Wriessnegger, T. (2020). Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances**, 40, 107520. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107520. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975020300173>. Acesso em: 06 dez. 2024.

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**, 2023, 13, 571. Doi: <https://doi.org/10.3390/catal13030571>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/13/3/571>. Acesso em: 62 dez. 2024

BRAZIL, T. R., JUNIOR, M. S. O., BALDAN, M. R., MASSI, M., REZENDE, M. C. Effect of different superficial treatments on structural, morphological and superficial area of Kraft lignin based charcoal. **Vibration Spectroscopy**, v. 99, p. 130-136, 2018.

FACIN, B.R., QUINTO, EG, VALERIO, A., OLIVEIRA, D. D., OLIVEIRA, JV, & FERNANDEZ-LORENTE, G. (2021). Estratégias para a imobilização da lipase Eversa[®] Transform 2.0 e aplicação para síntese de fosfolipídios. **Catalysts**, 11 (10), 1236. <https://doi.org/10.3390/catal11101236>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/10/1236>. Acesso em: 06 dez. 2024

FACIN, B. R., VALÉRIO, A., DE OLIVEIRA, D., & OLIVEIRA, J. V. (2020). Developing an immobilized low-cost biocatalyst for FAME synthesis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. doi:10.1016/j.bcab.2020.101752. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1878818120309415>. Acesso em: 08 dez. 2024

BULLO, GT, M, N., ALMEIDA, FLC ., FORTE, MBS (2024), Lipases: estudo de mercado e potenciais aplicações de derivados imobilizados. *Biocombustíveis, Bioprod. Bioref.*, 18: 1676-1689. doi: <https://doi.org/10.1002/bbb.2607>. Disponível em : <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbb.2607>. Acesso: 10 dez. 2014

CARDOSO, C. L., MORAES, M. C. D., & CASS, Q. B. (2009). Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, 32(1), 175-187.

CARVALHO DE MELO, ET AL. Use of Bioprinted Lipases in Microwave-Assisted Esterification Reactions. **Catalysts**, 2023, 13, 299. Doi:

<https://doi.org/10.3390/catal13020299>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/13/2/299>. Acesso: 10 dez.2024.

CAVALCANTI, M. H. D. S. **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. Disponível em: <https://bdtd.unifal-mg.edu.br:8443/handle/tede/1811>. Acesso: 15 dez. 2024.

COSTA-SILVA, T. A., CARVALHO, A. K. F., SOUZA, C. R. F., DE CASTRO, H. F., BACHMANN, L., SAID, S., & OLIVEIRA, W. P. (2021). Enhancement lipase activity via immobilization onto chitosan beads used as seed particles during fluidized bed drying: Application in butyl butyrate production. **Applied Catalysis A: General**, 622, 118217. doi:10.1016/j.apcata.2021.118217. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926860X21002313?via%3Di> hub. Acesso: 15 dez. 2024.

DAS, A., SINGH, J. & K.N, Y. 2017. Laccase immobilized magnetic iron nanoparticles: Fabrication and its performance evaluation in chlorpyrifos degradation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, vol. 117, pp. 183-189.

DA SILVA, APT; BREDDA, EH; DE CASTRO, HF; DA RÓS, PCM. Catálise enzimática: Um método ambientalmente amigável para aumentar a transesterificação de óleo de microalgas com óleo de fúsel para produção de ésteres de ácidos graxos com potencial aplicação como biolubrificantes. 2020. **Fuel**, Volume 273, 2020, 117786, ISSN 0016-2361. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.117786>. Acesso: 17 dez. 2024.

DA COSTA, FP., CIPOLATTI, EP., FURIGO, J.A., OLIVEIRA H. R. Nanoflowers: A New Approach of Enzyme Immobilization. **Chem Rec.** 2022 Apr;22(4):e202100293. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/tcr.202100293>. Acesso: 20 dez. 2024.

DAHMAN, B., BAGHDADI, A., & ALKATTAN, M. MICROBIAL LIPASES: Between Production, Purification, and Their Biotechnological Applications. **Currente Science Internacional**, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.36632/csi/2024.13.1.6>. Acesso: 30 dez. 2024.

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

DANGE, P.N.; KULKARNI, A.V.; RATHOD, V.K. Ultrasound assisted synthesis of methyl butyrate using heterogeneous catalyst. *Ultrasonics Sonochemistry*, vol. 26, p. 257–264, Sep. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.02.014>. Acesso: 05 jan. 2025.

OLIVEIRA, J. R. de. **Biofísica para ciências biomédicas**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da PUCRS, 2023. E-book. 300 p. ISBN 978-85-397-0829-1. Disponível em: <https://editora.pucrs.br/livro/579/>. Acesso: 06 jan. 2025

DE SOUZA, S. P. et al. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on epoxyfunctionalized silica: characterization and improving biocatalytic parameters. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 105–111, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.5327>. Acesso: 10 jan. 2025.

DE SOUSA, R.R. et al. Avaliação Técnico-Econômica – A Peça que Falta para Aumentar a Atratividade da Biocatálise Aplicada em Sínteses de Ésteres? **Catalisadores**, 2023, 13, 223. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal13020223>. Acesso: 10 jan.2025.

DENTI, A. F. Tecnologia enzimática: classificação, imobilização, suportes e aplicações. **Revista Perspectiva**, [S. l.], v. 45, n. 171, p. 97–110, 2021. DOI: 10.31512/persp.v.45.n.171.2021.168.p.97-110. Disponível em: <http://ojs.uricer.edu.br/ojs/index.php/perspectiva/article/view/168>. Acesso em: 16 jan. 2025.

DE HARO, J. C.; GARRIDO, M. del P.; PÉREZ, Á.; CARMONA, M.; RODRÍGUEZ, J. F. Full conversion of oleic acid to estolides esters, biodiesel and choline carboxylates in three easy steps. *Journal of Cleaner Production*, vol. 184, p. 579–585, May 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.190>. Acesso: 16 jan. 2025.

DENG, ZEXING; WANG, HONG; MA, PETER X.; GUO, BAOLIN. Self-healing conductive hydrogels: preparation, properties and applications. **Nanoscale**, vol. 12, no. 3, p. 1224–1246, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/C9NR09283H> Acesso: 16 jan. 2025.

DIAS, Suzana F.; VILAS-BOAS, L.; CABRAL, J. M. S.; FONSECA, M. M. R. Production of Ethyl Butyrate by *Candida rugosa* Lipase Immobilized in Polyurethane. **Biocatalysis**, vol. 5, no. 1, p. 21–34, 11 Jan. 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.3109/10242429109014852>. Acesso: 20 jan. 2025.

DONG, X., ZHANG, C., PATIL, P.J., LI, W., LI, X. Preparation of Proline-Modified UIO–66 Nanomaterials and Investigation of Their Potential in Lipase Immobilization. **Catalysts**. 2024, 14, 180. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/catal14030180>. Acesso: 22 jan. 2025.

FARIAS, M. Y. V. de. **Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na produção de ésteres. Monografia de Graduação em Engenharia Química**, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2017. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/36038>. Acesso: 25 jan. 2025.

FATHALLAH, A., AKBAR, H., AL-DEEN, F. Preparation and Characterization of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (Fe₃O₄) for Biological Applications. **Tikrit Journal of Pure Science**. 2022. 26. 83-91. 10.25130/tjps.v26i1.103. Disponível em: <https://www.tjpsj.org/index.php/tjps/article/view/103>. Acesso: 25 jan. 2025.

FERNANDES, K. F., LIMA, C. S., & LOPES, F. M. (2010). Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, 4(7), 53-58. Disponível em: https://ojs.rpqsenai.org.br/index.php/rpq_n1/article/view/107 . Acesso: 28 jan. 2025.

FRIEDRICH, J. L. R., PEÑA, F. P., GARCIA-GALAN, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., AYUB, M. A. Z., RODRIGUES, Rafael C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, vol. 88, no. 6, p. 1089–1095, 15 jun. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.3945>. Acesso: 29 jan. 2025.

GERMANO DE SOUSA, et al. (2022). Um novo biocatalisador híbrido de lipase Eversa[®] Transform 2.0 imobilizada e sua aplicação na síntese de biolubrificantes. **Biocatálise e Biotransformação**, 42 (2), 151–172. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10242422.2022.2144263>. Acesso: 29 jan. 2025.

GHETSI, G. F. **Estudo de resultados para fornecimento de biodiesel por transesterificação e determinação de rendimento por espectroscopia Raman**. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade de Brasília, Instituto de Química, Brasília, 2006. Disponível em: <http://repositorio.unb.br/handle/10482/8872>. Acesso: 02 fev. 2025.

GUASAMUCARÉ, R., ARIZAGA, L., PEREIRA, J. Estado da arte sobre nanopartículas bimetálicas com estrutura núcleo-coração: classificação, propriedades, síntese, caracterização e aplicações. **Revista Ciência e Engenharia**, v. 1, pág. 1-34, dez.-mar. 2020. ISSN 1316-7081, 2244-8780, Universidade dos Andes (ULA). Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/344082801_Estado_del_arte_sobre_nanopartículas_bimetálicas_con_estructura_nucleocoraza_clasificacion_propiedades_síntesis_caracterización_y_aplicaciones#fullTextFileContent. Acesso: 02 fev. 2025.

GUPTA, R., SOOD, A., KAUR, M. Lipases and their Applications in Biomedical Field, **Current Biotechnology**; Volume 12, Issue 1, Year 2023, e090123212467. DOI: 10.2174/2211550112666230109165101. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/367004440_Lipases_and_their_applications_in_biomedical_field. Acesso: 03 fev. 2025.

HASAN, F., SHAH, A. A., HAMEED, A. Aplicações industriais de lipases microbianas. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, **Elsevier** 39(2), 235251. doi:10.1016/j.enzmictec.2005.10.016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141022905004606?via%3Dihub>. Acesso: 03 fev. 2025.

HUANG, S., CHEN, G., & OUYANG, G. (2022). Confining enzymes in porous organic frameworks: From synthetic strategy and characterization to healthcare applications. **Chemical Society Reviews**. doi: 10.1039/d1cs01011e. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2022/cs/d1cs01011e>. Acesso: 04 fev. 2025.

HUSSAIN, M. et al. Lipases: Fontes, técnicas de imobilização e aplicações. **Revista Internacional de Meio Ambiente Agricultura e Biotecnologia** (ISSN: 2456-1878), vol 8, nº 6, 2023, pp.094-121 Publicações AI. doi:10.22161/ijeab.86.12. Disponível em: <https://www.lidsen.com/journals/cr/cr-02-02-013>. Acesso 04 fev. 2025.

IUPAC-IUBMB, Comissão Conjunta IUPAC-IUBMB sobre Nomenclatura Bioquímica (JCBN) e Comitê de Nomenclatura da IUBMB (NC-IUBMB), Boletim de 1999, Português J Biochem., 1999, vol. 264 (pág. 607 -609).

KRISCH, JUDIT., KERÉKES, ERIKA BEATA., TAKÓ, MIKLÓS., VÁGVÖLGYI, CSABA. Aplicação de células e enzimas imobilizadas na indústria alimentícia. **Fermentação microbiana e tecnologia enzimática**. 1.ed. CRC Press, 2020. e-book

ISBN 9780429061257. p. 115-127. Disponível em: <https://doi.org/10.1201/9780429061257-8>. Acesso 05 fev. 2025.

JAGTAP et., al. Biocatalysis for Green Synthesis: Exploring the Use of Enzymes and Microorganisms as Catalysts for Organic Synthesis, Highlighting Their Advantages over Traditional Chemical Catalysts in Terms of Selectivity, Efficiency, and Environmental Impact. 2024, **International Journal For Multidisciplinary Research**. Disponível em: <https://doi.org/10.36948/ijfmr.2024.v06i02.15356>. Acesso: 06 fev. 2025.

JOAN PLANAS-IGLESIAS., S. MARQUES, GASPAS P. PINTO., M. MUSIL, J. STOURAC, J. DAMBORSKÝ., D. BEDNÁŘ. Computational design of enzymes for biotechnological applications. **Biotechnology Advances**, Volume 47, 2021, 107696, ISSN 0734-9750. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2021.107696>. Acesso 08 fev. 2025.

RODRÍGUEZ-NÚÑEZ. Et al. Immobilized biocatalyst engineering: Biocatalytic tool to obtain attractive enzymes for industry. **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 242, Part 3, 2023, 125075, ISSN 0141-8130. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.125075>. Acesso: 10 fev. 2025.

KARIMI, M., JENKINS, B. & STROEVE, P. "Multi-objective optimization of transesterification in biodiesel production catalyzed by immobilized lipase: Multi-objective optimization of biodiesel production. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, vol. 10, no. 6, pp. 804-818. 2016. doi: 10.1002/bbb.1706. Disponível: <https://scijournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bbb.1706>. Acesso: 17 fev, 2025.

KERMASHA, SELIM; GILL, JAGPREET K. Capítulo Seis - Imobilização de enzimas e sua utilização em aplicações biotecnológicas. In: **novas abordagens biotecnológicas para a indústria alimentar**. 2021. pág. 133-170. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800217-9.00006-X>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B978012800217900006X>. Acesso: 03 maio. 2025.

K. PETCHAROEN, A. S. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles via the chemical co-precipitation method. **Materials Science and Engineering: B**, Volume 177, Issue 5, 2012, Pages 421-427, ISSN 0921-5107. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/257341823_Synthesis_and_characterization_of_magnetite_nanoparticles_via_the_chemical_co-precipitation_method. Acesso: 19 fev. 2025.

KONWARH R., KARAK N., RAI SK., MUKHERJEE AK. Polymer-assisted iron oxide magnetic nanoparticle immobilized keratinase. **Nanotechnology**. 2009 Jun 3;20(22):225107. doi: 10.1088/0957-4484/20/22/225107. Epub 2009 May 12. PMID: 19433867. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/20/22/225107>. Acesso: 27 fev. 2025.

LATHA, S., SELVAMANI, P., PALANISAMY, S., GOVINDARAJ, D., & THANGAVELU, P. (2021). Magnetic Nanoparticles. Handbook of Research on Nano-Strategies for Combatting Antimicrobial Resistance and Cancer. Disponível em: <https://dSPACE.kpfu.ru/xmlui/handle/net/181208?show=full>. Acesso: 03 març. 2025

LIMA, P. J. Morais. **Preparação de biocatalisadores heterogêneos através da imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em SBA-15 com poros expandidos**. 2024. 97 f.: il. color. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Ceará. Disponível em: https://repositorio.ufc.br/bitstream/riufc/79249/1/2024_tese_pjmlima.pdf. Acesso: 03 març 2025.

LIMA, R. A. Ferreira. **Desenvolvimento de culturas mistas para a produção de poligalacturonases bacterianas isoladas de frutos amazônicos**. 2024. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Tocantins, Tocantins, 2024. Disponível em: <https://repositorio.uft.edu.br/handle/11612/7004>. Acesso em: 05 març 2025

LI, D., SHI, Q., LIANG, F., FENG, D. The Green Synthesis of Biodiesel via Esterification in Water Catalyzed by the Phosphotungstic Acid-Functionalized Hydrophobic MCM-41 Catalyst. **Catalysts**, 2024, 14, 142. <https://doi.org/10.3390/catal14020142>. Disponível em <https://www.mdpi.com/2073-4344/14/2/14>. Acesso: 06 març 2025.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J., BENAIGES, M.D., VALERO, F. Constitutive Expression in *Komagataella phaffii* of Mature *Rhizopus oryzae* Lipase Jointly with Its Truncated Prosequence Improves Production and the Biocatalyst Operational Stability. **Catalysts**, 2021, 11, 1192. <https://doi.org/10.3390/catal11101192>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/11/10/1192>. Acesso: 10 març 2025.

MATSUTA Y., ITO M., TOHSATO Y. ECOH: Um preditor de número da Comissão de Enzimas usando informação mútua e uma máquina de vetor de suporte, **Bioinformática**, Volume 29, Edição 3, fevereiro de 2013, Páginas 365–372, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts700>. Disponível em: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/29/3/365/257645?login=false>. Acesso: 12 març 2025.

MARTÍNEZ-SANCHEZ, J.A., ARANA-PEÑA, S., CARBALLARES, D., YATES, M., OTERO, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilized Biocatalysts of Eversa® Transform 2.0 and Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Comparison of Some Properties and Performance in Biodiesel Production. **Catalysts** 2020, 10, 738. <https://doi.org/10.3390/catal10070738>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/7/738>. Acesso em: 16 març 2025.

MATYSIK J., DŁUGOSZ O., BANACH M. Development of Nanozymatic Characteristics in Metal-Doped Oxide Nanomaterials. *J Phys Chem B*. 2024 Aug 22;128(33):8007-8016. doi: 10.1021/acs.jpcb.4c02526. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jpcb.4c02526>. Acesso: 20 març 2025.

MANTHA, S.; PILLAI, S.; KHAYAMBASHI, P.; UPADHYAY, A.; ZHANG, Y.; TAO, O.; PHAM, H. M.; TRAN, S. D. Smart Hydrogels in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Materials*, vol. 12, no. 20, p. 3323, 12 Oct. 2019. <https://doi.org/10.3390/ma12203323>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1996-1944/12/20/3323>. Acesso: 27 març 2025.

MISHRA, S., YADAV, M. (2024). Magnetic Nanoparticles: A Comprehensive Review from Synthesis to Biomedical Frontiers. *Langmuir*, **American Chemical Society**, 2024.

doi: 10.1021/acs.langmuir.4c01532. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr300068p>. Acesso: 28 març. 2025.

MIGUEL JÚNIOR, J., MATTOS, F.R., COSTA, G.R., ZURLO, A.B.R., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., MENDES, A.A. Improved Catalytic Performance of Lipase Eversa® Transform 2.0 via Immobilization for the Sustainable Production of Flavor Esters—Adsorption Process and Environmental Assessment Studies. **Catalysts**, 2022, 12, 1412. <https://doi.org/10.3390/catal12111412>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/12/11/1412>. Acesso: 28 març. 2025.

MIRANDA, L. P., GUIMARÃES, J. R., GIORDANO, R. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., & TARDIOLI, P. W. Composites of Crosslinked Aggregates of Eversa® Transform and Magnetic Nanoparticles. Performance in the Ethanolysis of Soybean Oil. **Catalysts**, 2020, 10(8), 817. Doi: <https://doi.org/10.3390/catal10080817>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/10/8/817>. Acesso: 20 març. 2025.

MONTEIRO, R.R.C., NETO, D.M.A., FECHINE, P.B.A., LOPES, A.A.S., GONÇALVES, L.R.B., DOS SANTOS, J.C.S., DE SOUZA, M.C.M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Ethyl Butyrate Synthesis Catalyzed by Lipases A and B from *Candida antarctica* Immobilized onto Magnetic Nanoparticles. Improvement of Biocatalysts' Performance under Ultrasonic Irradiation. **Int. J. Mol. Sci.** 2019, 20, 5807. <https://doi.org/10.3390/ijms20225807>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/20/22/5807>. Acesso: 01 abr. 2025.

MOKHTAR, N.; RAHMAN, R.; SANI, F.; & ALI, M. Extraction and reimmobilization of used commercial lipase from industrial waste. **International journal of biological macromolecules**. Volume 176, 2021, Pages 413-423, ISSN 0141-8130, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.001>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813021002695?via%3Dihub>. Acesso: 05 abr. 2025.

MUN YUEN, C. E., CHAN, C.P. S. 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** (2021), Volume 283. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119266>. Disponível: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0016236120322626?via%3Dihub>. Acesso: 08 abr. 2025.

NELSON, DL; COX, MM. Lehninger. **princípios de bioquímica**. 4.ed. Nova York: WH Freeman, 2004.

N. BASHIR, M. SOOD E J. BANDRAL. "Imobilização enzimática e suas aplicações no processamento de alimentos: uma revisão." **International Journal of Chemical Studies**, 8 (2020): 254-261. Doi: 10.22271/chemi.2020.v8.i2d.8779. Disponível em: <https://www.chemijournal.com/archives/?year=2020&vol=8&issue=2&ArticleId=8779&si=false>. Acesso: 11 abr. 2025.

NGUYEN, et al. One-pot synthesis of biodiesel from acid oil using a switchable solvent, 1,8-diazabicyclo [5.4.0] undec-7-ene (DBU), as a Bifunctional Catalyst, **International Journal of Energy Research**, 2023, 2171897, 12 pages, 2023. <https://doi.org/10.1155/2023/2171897>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1155/2023/2171897>. Acesso: 14 abr. 2025.

OLIVEIRA, M. et al. Imobilização de lipases: uma visão geral dos métodos de imobilização e aplicações. 2021, livro: **Ciência, Tecnologia e Inovação: A Nova Produção do Conhecimento**. doi: 10.22533/at.ed.49621090312. Disponível em: <https://atenaeditora.com.br/catalogo/ebook/ciencia-tecnologia-e-inovacao-a-nova-producao-do-conhecimento>. Acesso: 16 abr. 2025

OSAMA M. DARWESH., SAMEH S. ALI., IBRAHIM A. MATTER., TAMER ELSAMAHY., YEHIA A. MAHMOUD. Chapter Twenty - Enzymes immobilization onto magnetic nanoparticles to improve industrial and environmental applications, Editor(s): Challa V. Kumar, Methods in Enzymology, **Academic Press**, Volume 630,2020, Pages 481-502, ISSN 0076-6879, ISBN 9780128201435, <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2019.11.006>.Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S007668791930463X?via%3Dihub>. Acesso: 18 abr. 2025.

OKE M., OJO AS., FASIKU AS., ADEBAYO EA. Nanotechnology and enzyme immobilization: a review. Nanotechnology. 2023 Jul 3;34(38). PMID: 37257425. Doi: 10.1088/1361-6528/acda35. Disponível em: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1361-6528/acda35>. Acesso: 20 abr. 2025.

PALMER, T. **Understanding enzymes**. 4. ed. [S.1.]: Oxford: Prentice Hall, 1995.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, fev. 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100018>. Acesso: 20 abr. 2025.

PATTARAWAN, I. ET AL. Enzymes, In Vivo Biocatalysis, and Metabolic Engineering for Enabling a Circular Economy and Sustainability. Chemical Reviews, **American Chemical Society**, 2021. doi: 10.1021/acs.chemrev.1c00121. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.chemrev.1c00121>. Acesso: 20 abr. 2025.

PATEL, M. T.; NAGARAJAN, R.; KILARA, A. Lipase-catalyzed biochemical reactions in novel media: a review. **Chemical Engineering Communications**, v. 152–153, n. 1, p. 365–404, 25 out. 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/00986449608936574>. Acesso: 21 abr. 2025

PATIL, P.J., KAMBLE, S.A., DHANAVADE, M.J., LIANG, X., ZHANG, C., LI, X. Molecular Modeling Insights into Metal-Organic Frameworks (MOFs) as a Potential Matrix for Immobilization of Lipase: An In Silico Study. **Biology**, 2023, 12, 1051. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology12081051>. Acesso: 21 abr. 2025.

PATIL, P. et al. Recent Trends in Metal-Organic Frameworks Mediated Lipase Immobilization: A State of the Art Review. Food Safety and Health. 2023, 1 (2), 139 – 169. <https://doi.org/10.1002/fsh3.12021>. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/fsh3.12021>. Acesso: abr. 2025.

PAPAMICHAEL, E., FOUKIS, A., GKINI, O., STERGIOU, P. The mechanism of lipase-catalyzed synthesis of food flavoring ethyl butyrate in a solvent-free system. **Journal of Food Nutrition and Metabolism**. 2019. <https://doi.org/10.31487/j.jfnm.2019.03.01>. Disponível em: https://www.sciencerepository.org/articles/the-mechanism-of-lipase-catalyzed-synthesis-of-food-flavoring-ethyl-butyrate-in-a-solvent-free-system_JFNM-2019-3-101.pdf. Acesso: 22 abr. 2025.

PALUDO, N., ALVES, J., ALTMANN, C., AYUB, M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. (2015). The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics sonochemistry**, 22, 89-94. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2014.05.004>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350417714001503?via%3Dihub>. Acesso: 22 abr. 2025.

PEREIRA, A.D.S., DE SOUZA, A.H., FRAGA, J.L., VILLENEUVE, P., TORRES, A.G., AMARAL, P.F.F. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. **Catalysts** 2022, 12, 88. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/12/1/88>. Acesso; 25 abr. 2025.

PEREIRA, A. DA S.; DE SOUZA, A. H.; FRAGA, J. L.; VILLENEUVE, P; TORRES, A. G.; AMARAL, P. F. F. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. *Catalysts*, vol. 12, no. 1, p. 88, 13 jan. 2022. <https://doi.org/10.3390/catal12010088>.

QUEISSADA, D. D.; DA SILVA, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 271–286, 2020. DOI: 10.14295/holos.v20i2.12378. Disponível em: <https://www.cea-unesp.org.br/holos/article/view/12378/8288>. Acesso: 23 abr. 2025.

RAMOS P. R., DE OLIVEIRA A. L., RAMOS G. V. C., KAMIMURA ES. Esterification Process in Supercritical Carbon Dioxide Catalyzed by *Geotrichum candidum* Lipase Produced with Mozzarella Cheese Whey and Corn Steep Liquor. **Processes**. 2024; 12(10):2086. <https://doi.org/10.3390/pr12102086>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9717/12/10/2086>. Acesso: 25 abr. 2025.

RIBEIRO-SANTOS, R., SOUZA, A. L. R., TROMBETE, F. M., MELO, N. R. Proteína do soro de leite: Aproveitamento e aplicações na produção de embalagem biodegradável. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 51–58, 2015. DOI: 10.18378/rvads.v10i5.3033. Disponível em: <https://www.gvaa.com.br/revista/index.php/RVADS/article/view/3033>. Acesso em: 27 fev. 2025.

RIOS, N.S. et al. Applicability of mesoporous silica type SBA-15 as feasible support for the immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase and *Candida antarctica* lipase B, *Braz. J. Química. Eng.* 39 (2022). Doi: DOI: 10.1007/s43153-021-00218-y. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s43153-021-00218-y>. Acesso: 27 abr. 2025.

R. BULLER. et al. Bornscheuer. "From nature to industry: Harnessing enzymes for biocatalysis. *Science*, 382, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.adh8615>. Acesso 27. Abr. 2025.

RODOLPHO R.C. et al. Eversa transform 2.0 immobilized on a hydrophobic support enables the solvent-free almost quantitative esterification of the free fatty acids from soybean oil with neopentylglycol. **Renewable Energy**. Volume 237, Part A. 2024. 121598, ISSN 0960-1481. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2024.121598>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960148124016665?via%3Dihub>. Acesso: 29 abr. 2025.

RODOLPHO R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?. **Renewable Energy**, Volume 164, 2021, Pages 1566-1587, ISSN 0960-1481. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.071>. Acesso: 29 abr. 2025.

ROMANO, I. P. et al. Avaliação da biomassa de fungos amazônicos como fonte de lipases para biocatálise. **Química Nova**, v. 43, n. 2, p. 146-154, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170470>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/97sFtq6RyCdGdNvww8WvM3R/?format=pdf&lang=pt>. Acesso: 29 abr. 2025.

DOS SANTOS KM. Et al. Enhanced Biodiesel Production with Eversa Transform 2.0 Lipase on Magnetic Nanoparticles. **Langmuir**. 2024 Dec 24;40(51):26835-26851. doi: 10.1021/acs.langmuir.4c02542. Epub 2024 Nov 26. PMID: 39591534; PMCID: PMC11673575. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.langmuir.4c02542?ref=article_openPDF. Acesso: 30 abr. 2025.

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. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.004>. Acesso: 30 abr. 2025.

SARNO, M., IULIANO, M., POLICHETTI, M., CIAMBELLI, P. (2017). High activity and selectivity immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles for banana flavour synthesis. **Process Biochemistry**, 56, 98–108. doi:10.1016/j.procbio.2017.02.004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511316311424>. Acesso: 30 abr. 2025.

SAMROT, A. V., SAHITHYA, C. S., SELVARANI A, J., PURAYIL, S. K., & PONNAIAH, P. (2020). A Review on Synthesis, Characterization and Potential Biological Applications of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, 100042. doi:10.1016/j.crgsc.2020.100042. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/347765682_A_Review_on_Synthesis_Characterization_and_Potential_Biological_Applications_of_Superparamagnetic_Iron_Oxide_Nanoparticles. Acesso: 30 abr 2025.

SERPA, J. F. et al. New nanocomposite made of cashew apple bagasse lignin and Fe₃O₄ for immobilizing of lipase B from *Candida antarctica* aiming at esterification. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 96, p. 2472-2487, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jctb.6770>. Acesso: abr 2025.

SILVA, G. A. R. ET AL. Brackmann, R., Langone, M. A. P. Ethyl esters synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles. **Catalysis Today** v.1, p. 115099, 2025. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2024.115099>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0920586124005935>. Acesso: 30 abr. 2025.

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. Doi: <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150575>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/m5z3LbyYSKZBKgKKZ9cLqfH/?format=pdf&lang=en>. Acesso: 01 maio. 2025.

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. Disponível em: <http://repositorio.ufc.br/handle/riufc/5041>. Acesso: 01 maio. 2025.

STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**. 2013, 31(8), 1846–1859. Doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.08.006. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/255969734_Advances_in_Lipase-Catalyzed_Esterification_Reactions. Acesso: 02 maio. 2025.

SCHEMBERG J. et al. Synthesis of Biocompatible Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION) under Different Microfluidic Regimes. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2022 Oct 26;14(42):48011–48028. doi: 10.1021/acsami.2c13156. Epub 2022 Oct 12. PMID: 36223272; PMCID: PMC9615998. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsami.2c13156?ref=article_openPDF. Acesso: 02 maio. 2025.

SHELDON, R. A., VAN PELT, S. (2013). Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.*, 42(15), 6223–6235. doi:10.1039/c3cs60075k. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2013/cs/c3cs60075k>. Acesso: 02 maio. 2025.

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. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.09.011>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1369703X11002567?via%3Di> hub. Acesso: 02 maio. 2025

SIMÕES, C. M. de F., CONSOLI, Katrine. Potencial das enzimas microbianas para a indústria. In: Anais do CONIGRAN 2020 - Congresso Integrado UNIGRAN Capital. **Anais. Campo Grande (MS) UNIGRAN Capital**, 2020. Disponível em: <https://www.even3.com.br/anais/conigran2020/246899-POTENCIAL-DAS-ENZIMAS-MICROBIANAS-PARA-A-INDUSTRIA>. Acesso: 02 maio. 2025.

SHI, Y.; ZHOU, H.; DAI, L.; LIU, D.; DU, W. Preparation of Ordered Macroporous ZIF-8-Derived Magnetic Carbon Materials and Its Application for Lipase Immobilization. **Catalysts**, 2024, 14, 55. <https://doi.org/10.3390/catal14010055>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4344/14/1/55>. Acesso: 02 maio. 2025.

SUO, H. ET AL. Covalent immobilization of lipase on an ionic liquid-functionalized magnetic Cu-based metal-organic framework with boosted catalytic performance in flavor ester synthesis. **Journal of materials chemistry. B**. The Royal Society of Chemistry, 2023. <http://dx.doi.org/10.1039/D2TB02246J>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2023/tb/d2tb02246j>. Acesso: 05 maio. 2025.

TAN, W., ZHANG, Q., LEE, M., LAU, W., & XU, B. (2024). Enzymatic control of intermolecular interactions for generating synthetic nanoarchitectures in cellular environment. **Science and Technology of Advanced Materials**, 25(1). <https://doi.org/10.1080/14686996.2024.2373045>. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/epdf/10.1080/14686996.2024.2373045?needAccess=true>. Acesso: 07 maio. 2025.

VALENZUELA, R. et al. Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe₃O₄) by the co-precipitation method. **Journal of Alloys and Compounds**. 2009, 488(1), 227-231. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2009.08.087>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0925838809016545>. Acesso em: 08 maio. 2025.

V. M. COSTA; M. C. M. DE SOUZA; P. B. A. FECHINE; A. C. MACEDO; L. R. B. GONÇALVES. Nanobiocatalytic systems based on lipase-fe₃o₄ and conventional systems for isoniazid synthesis: a comparative study. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v.33, pp.661–673, 2016. Doi: 10.1590/0104-6632.20160333S20150137. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjce/a/LJBFbNkDvMrvXKQC9knbbQB/?lang=en>. Acesso: 10 maio. 2025.

VOET, D.; VOET, J. **Biochemistry**. 2. ed. New Youk: John Wiley e Sons, p.1361, 1995.

WANG, L., DU, X., LI, Y., BAI, Y., TANG, T., WU, J., LIANG, H., & GAO, D. (2023). Enzyme immobilization as a Sustainable approach toward ecological remediation of organic-contaminated soils: Advances, issues, and future perspectives. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. 53, 1684 - 1708. <https://doi.org/10.1080/10643389.2023.2180285>. Disponível em: https://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10643389.2023.2180285?casa_token=ZIFfwMywZaIAAAAAA:wzotgms4eGv3tqK_kvFIzPnx1vHRsHwP0El32CPKQDgLf6oAYFFqWC6pz4Nc95eP-0SrSLCj32OOMy9zw. Acesso: 10 maio. 2025.

WANG, K. et al. Upgrading Waste Polylactide via Catalyst-Controlled Tandem Hydrolysis-Oxidation **ChemSusChem**, 2023, e202301128. doi.org/10.1002/cssc.202301128. Disponível em: <https://chemistry-europe.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cssc.202301128>. Acesso: 13 maio. 2025.

XIN WANG, YUTONG FANG, YING-WEI YANG. Nanozymes for biomedical applications. **APL Mater.** 1 October 2024; 12 (10): 100401. <https://doi.org/10.1063/5.0237766>. Disponível em: <https://pubs.aip.org/aip/apm/article/12/10/100401/3315248/Nanozymes-for-biomedical-applications>. Acesso: 16 maio. 2025.

WANG, Y. et al. Microfluidic synthesis of hemin@ZIF-8 nanozyme with applications in cellular reactive oxygen species detection and anticancer drug screening. Lab on a Chip, **The Royal Society of Chemistry**, 2024. <https://doi.org/10.1039/d4lc00290c>. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2024/lc/d4lc00290c>. Acesso 16 maio. 2025.

WILTSCHI B, et al. Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: From enzyme discovery to special applications. **Biotechnol Adv.** 2020 May-Jun; 40:107520. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107520. Epub 2020 Jan 23. PMID: 31981600. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975020300173?via%3Dihub>. Acesso: 17 maio. 2025.

YU, Z.; ZHANG, H.; FU, X.; LI, X.; GUO, Q.; YANG, T.; LI, X. Immobilization of Esterase Sule in Cross-Linked Gelatin/Chitosan and Its Application in Remediating Soils Polluted with Tribenuron-Methyl and Metsulfuron-Methyl. **Process Biochemistry**, v. 98, p. 217-223, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.08.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1359511320307297?via%3Dihub>. Acesso: 18 maio. 2025.

YASMIN R. MAGHRABY, REHAN M. EL-SHABASY, AHMED H. IBRAHIM, AND H. M. AZZAZY. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, 5184519686, American Chemical Society, 2023, 5184 - 5196. <https://doi.org/10.1021/acsomega.2c07560>. Disponível em: https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acsomega.2c07560?ref=article_openPDF. Acesso: 18 maio. 2025.

ZHANG, B., ZHOU, Y., LIU, C., ALHADI, A. M. M., CHEN, Z., & CHEN, Z. (2022). Immobilized penicillin g acylase with enhanced activity and stability using glutaraldehyde-modified polydopamine-coated fe₃o₄ nanoparticles. **Biotechnol Appl Biochem**. 69: 629–641. <https://doi.org/10.1002/bab.2138>. Disponível em: <https://iubmb.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/bab.2138>. Acesso: 19 maio. 2025.

ZHANG, S. et al. Hollow Mesoporous Carbon-Based Enzyme Nanoreactor for the Confined and Interfacial Biocatalytic Synthesis of Phytosterol Esters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2023. doi: 10.1021/acs.jafc.2c06756. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.2c06756>. Acesso: 19 maio. 2025.

ZHAO, J. et al. Production, purification, properties and current perspectives for modification and application of microbial lipases. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, 2024, 54(8), 1001–1016. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10826068.2024.2323196>. Acesso: 19 maio. 2025.

ZATTA, F., N; FILHO, E., Tambosi; FREITAS, R., R de. COMPETÊNCIAS OPERACIONAIS PARA ALCANÇAR VANTAGENS COMPETITIVAS: ESTRATÉGIAS DE EXPLORAÇÃO DE RECURSOS INTERORGANIZACIONAIS. **Brazilian Journal of Production Engineering**, São Mateus, Espírito Santo, Brazil, v. 5, n. 1, p. 220–245, 2019. Disponível em: https://periodicos.ufes.br/bjpe/article/view/V05N01_13. Acesso em: 30 jun. 2025.

ZHAO, Z. Enzyme-Catalyzed Synthesis in Pharmaceutical Manufacturing. **Highlights in Science, Engineering and Technology**, [S. l.], v. 91, p. 277–282, 2024. doi: <https://doi.org/10.54097/qwrewm86>. Disponível em: <https://drpress.org/ojs/index.php/HSET/article/view/20063/19636>. Acesso: 19 maio. 2025.

ŽNIDARŠIČ-PLAZL, Polona. Let the biocatalyst flow. **Acta Chimica Slovenica**, Ljubljana, v. 68, n. 1, p. 23–30, 2021. **Doi:** <https://doi.org/10.17344/acsi.2020.6488>.

Disponível em: <https://acsi-journal.eu/index.php/ACSi/article/view/6488/2967>.
Acesso: 19 maio. 2025.