



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA E FÍSICO-QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ÉRICO CARLOS DE CASTRO

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SUPORTE HETEROFUNCIONAL DE
 Fe_3O_4 @DTPMP-GLU PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM
2.0.

FORTALEZA

2025

ÉRICO CARLOS DE CASTRO

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SUPORTE HETEROFUNCIONAL DE
 Fe_3O_4 @DTPMP-GLU PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do Título de Mestre. Área de Concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.

Coorientador: Dr. Tiago Melo Freire.

FORTALEZA

2025

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- C353d Castro, Érico Carlos de.
Desenvolvimento de um novo suporte heterofuncional de Fe₃O₄@DTPMP-GLU para imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 / Érico Carlos de Castro. – 2025.
151 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2025.
Orientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santo.
Coorientação: Prof. Dr. Tiago Melo Freire.
1. Imobilização enzimática. 2. Lipase. 3. Planejamento Taguchi. 4. Parâmetros de imobilização. 5. Suporte heterofuncional. I. Título.

CDD 540

ÉRICO CARLOS DE CASTRO

DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO SUPORTE HETEROFUNCIONAL DE
 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ PARA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE EVERSA® TRANSFORM 2.0.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: 07/10/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Marcos Carlos de Mattos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Antônio Eufrásio Vieira Neto
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste trabalho representa o culminar de uma jornada marcada por desafios, aprendizados e crescimento pessoal e acadêmico. Ao final deste percurso, sinto-me profundamente grato a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste sonho.

Em primeiro lugar, dedico minha mais profunda gratidão ao meu pai, Artur Moreira de Castro, cuja força, exemplo de perseverança e amor incondicional sempre me inspiraram a seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis. Sua vida é um constante lembrete de que o trabalho sério e a ética são pilares essenciais para qualquer conquista. À minha mãe, Albertina Carlos de Castro, a quem devo não apenas a vida, mas também o carinho, a paciência e o apoio inabalável em todos os momentos. Sua presença amorosa foi meu porto seguro ao longo desta trajetória.

Agradeço imensamente ao meu orientador, Prof. Dr. José Cleiton, por sua dedicação, sabedoria e confiança em meu potencial. Sua orientação rigorosa, mas sempre respeitosa, foi fundamental para o desenvolvimento deste trabalho. Aprendi não apenas com sua vasta experiência científica, mas também com sua postura ética e comprometida com a formação de novos pesquisadores.

Sou igualmente grato aos professores Pierre Basilio, Ronaldo Ferreira e Marcos Carlos, do Departamento de Química da Universidade Federal do Ceará (UFC), por suas contribuições valiosas ao longo do meu percurso acadêmico. Seu conhecimento, disponibilidade e incentivo foram essenciais para minha formação e para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas Victor Moreira, Tatiana Sainara e Rafael Fernandes, agradeço pela amizade, pela troca de ideias, pelos momentos de apoio e pelas risadas que aliviaram os dias mais intensos. O convívio com vocês enriqueceu minha experiência no programa de pós-graduação e tornou essa caminhada muito mais humana e significativa.

Por fim, agradeço a mim mesmo por não desistir, mesmo quando o caminho parecia árduo. E a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa história — meu muito obrigado.

"Melhor conquistar a si mesmo que conquistar a outros. Nem um deus nem um semideus, nem Mara e nem Brahma podem desfazer a vitória daquele que conquistou a si mesmo e que se conduz sempre com moderação". (Dhammapada, 2011).

RESUMO

Este estudo desenvolveu e avaliou um novo suporte heterofuncional à base de nanopartículas magnéticas de magnetita (Fe_3O_4) funcionalizadas com ácido dietilenotriaminopenta (metileno fosfônico) (DTPMP) por meio do método sonoquímico, seguido de ativação com glutaraldeído (GLU) para a imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 (ET2). A otimização do processo de imobilização foi conduzida utilizando o método Taguchi, determinando as condições ideais como tempo de reação (6 h), força iônica (5 mM), carga enzimática (5 mg de ET2 por grama de suporte) e temperatura (40 °C). O suporte foi caracterizado estrutural e magneticamente por difração de raios X (XRD), magnetômetro de amostra vibrante (VSM), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e fluorescência de raios X (XRF), confirmando a funcionalização do suporte e a imobilização da enzima. A estabilidade e o desempenho catalítico foram avaliados por testes de dessorção, reuso, capacidade de carga do suporte e resistência a solventes orgânicos. A atividade da ET2 imobilizada é reduzida para 54,08% após dez ciclos de reuso. O rendimento de imobilização foi de $60,53\% \pm 1,37$ com atividade relativa de $92,37\% \pm 2,26$. Entre os solventes heptano, hexano, ciclo-hexano, tetraidrofurano (THF) e acetonitrila, a atividade foi melhorada apenas na presença de acetonitrila e tetraidrofurano. Embora o suporte não tenha promovido aumento da atividade em diferentes pH's e temperaturas em comparação à enzima livre, os resultados demonstram seu potencial como uma plataforma eficiente para a imobilização de lipases, conferindo estabilidade e reusabilidade da ET2 imobilizada. O acoplamento molecular entre o suporte e a ET2 foi avaliado através de docking molecular, que demonstrou que o GLU atua como elo funcional entre a ET2 e o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, favorecendo a imobilização eficiente da enzima.

Palavras-chave: imobilização enzimática; nanopartículas magnéticas; lipase Eversa® Transform 2.0; suporte heterofuncional; estabilidade enzimática.

ABSTRACT

This study developed and evaluated a new heterofunctional support based on magnetic magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles functionalized with diethylenetriaminepenta (methylene phosphonic acid) (DTPMP) through the sonochemical method, followed by activation with glutaraldehyde (GLU) for the immobilization of Eversa® Transform 2.0 lipase (ET2). The optimization of the immobilization process was carried out using the Taguchi method, determining the ideal conditions such as reaction time (6 h), ionic strength (5 mM), enzyme load (5 mg of ET2 per gram of support) and temperature (40 °C). The support was characterized structurally and magnetically by X-ray diffraction (XRD), vibrating sample magnetometer (VSM), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetry (TGA), scanning electron microscopy (SEM) and X-ray fluorescence (XRF), confirming the functionalization of the support and the immobilization of the enzyme. Stability and catalytic performance were evaluated by desorption, reuse, support load capacity, and organic solvent resistance tests. The activity of immobilized ET2 decreased to 54.08% after ten reuse cycles. The immobilization yield was $60.53\% \pm 1.37$, with a relative activity of $92.37\% \pm 2.26$. Among the solvents heptane, hexane, cyclohexane, tetrahydrofuran (THF), and acetonitrile, activity was improved only in the presence of acetonitrile and tetrahydrofuran. Although the support did not promote increased activity at different pHs and temperatures compared to the free enzyme, the results demonstrate its potential as an efficient platform for lipase immobilization, conferring stability and reusability of immobilized ET2. The molecular coupling between the support and ET2 was evaluated through molecular docking, which demonstrated that GLU acts as a functional link between ET2 and the $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ support, favoring the efficient immobilization of the enzyme.

Keywords: enzyme immobilization; magnetic nanoparticles; Eversa® Transform 2.0 lipase; heterofunctional support; enzyme stability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Produção científica anual e citações indexadas no Web of Science de 2005 a 2025, relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.....	24
Figura 2 – As 10 principais áreas de pesquisa relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.....	25
Figura 3 – Distribuição percentual de registros das 10 principais áreas de pesquisa relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.....	26
Figura 4 – Visualização do mapa de rede dos países que mais publicaram de 2014 a 2020.....	27
Figura 5 – Mapa de visualização de rede relacionado à colaboração entre instituições mais produtivas.....	28
Figura 6 – Visualização em cluster da referência de cocitação.....	29
Figura 7 – Mapa de visualização da rede de cocitação de palavras-chave em pesquisas relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.....	31
Figura 8 – Mapa de evolução do uso de palavras-chave relevantes ao longo do tempo.....	32
Figura 9 – Mapa de densidade de cocitação de palavras-chave no banco de dados relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.....	33
Figura 10 – Representação esquemática das principais estratégias de imobilização enzimática.....	43
Figura 11 – Proposta de mecanismo de ligação entre $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ e GLU.....	68
Figura 12 – Possíveis regiões de interação entre o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ -GLU e a enzima ET2 na presença de surfactante.....	69
Figura 13 – Atividade enzimática do $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$ produzido com suporte ativado em diferentes concentrações de GLU.....	70
Figura 14 – Possíveis interações entre a ET2 e o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ -GLU em baixas forças iônicas e na presença de Triton X-100.....	71
Figura 15 – Em a) gráfico de superfície de contorno e b) gráfico de superfície contorno 3D, para a imobilização de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$, demonstram a relação entre carga enzimática (mg/g) e força iônica (mM), considerando a atividade da ET2 imobilizada como resposta.....	74
Figura 16 – Efeito das variáveis independentes em termos de relações S/R.....	76
Figura 17 – Estabilidade em ciclos de reuso do $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP}@ET2$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$ ativado com 2,5% de GLU, ambos produzidos em condições ótimas de imobilização e com as atividades iniciais estabelecidas como 100%...	78

Figura 18 – Capacidade máxima de carga enzimática de Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2 ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização..	80
Figura 19 – Estabilidade em solventes orgânicos de ET2 e Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização com suas atividades em tampão pH 7 estabelecidas como 100%.....	81
Figura 20 – Estabilidade de ET2 e Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização em diferentes faixas de pH.....	83
Figura 21 – Estabilidade térmica de ET2 e Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização.....	84
Figura 22 – Estabilidade de armazenamento do Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2 durante 60 dias, armazenado a 4 °C, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização.....	85
Figura 23 – Difrátogramas das amostras Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2, Fe ₃ O ₄ @DTPMP- GLU, Fe ₃ O ₄ @DTPMP e Fe ₃ O ₄	86
Figura 24 – Curvas de histerese magnética dos materiais em suas diferentes etapas de recobrimento.....	87
Figura 25 – Bandas de FTIR dos materiais em suas diferentes etapas de recobrimento.....	89
Figura 26 – a) Análise termogravimétrica e b) termogravimétrica-diferencial, ambas dos materiais em suas diferentes etapas de recobrimento.....	90
Figura 27 – SEM/XRF e espectros elementares a) Fe ₃ O ₄ ; b) Fe ₃ O ₄ @DTPMP; c) Fe ₃ O ₄ @DTPMP-GLU e d) Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2.....	91
Figura 28 – Micrografias de TEM do suporte Fe ₃ O ₄ @DTPMP-GLU. Detalhe: curva de distribuição de tamanho obtida a partir da análise TEM.....	92
Figura 29 – Complexo formado entre o resíduo-chave da lipase ET2, Lysine (cartoon verde), com o ligante GLU (stick rosa): interação promovida a partir de 3 ligações químicas (dots amarelos), que variam de 1,1 a 3,3 Å.....	93
Figura 30 – Complexo DTPMP-GLU-Lys evidenciando a atuação do GLU como intermediário, se ligando ao DTPMP em uma extremidade e à Lysine em outra extremidade, conforme descrito anteriormente (MIRANDA et al., 2020): a interação da Lysine com o GLU é estabelecida através de 3 ligações químicas (1,1 a 3,3 Å) e a complexação do DTPMP através de 3 ligações químicas (3,3 a 1,6 Å).....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – As 20 palavras-chave mais relevantes na área de materiais como suporte para imobilização enzimática.	30
Tabela 2 – Os dez trabalhos mais citados na área de materiais como suporte para imobilização enzimática.	35
Tabela 3 – Exemplos de enzimas imobilizadas, incluindo o tipo de material de suporte, método de imobilização, agentes de reticulação ou ativação (quando aplicável) e referências bibliográficas representativas. As estratégias listadas ilustram a diversidade de interações enzima-suporte e modificações químicas utilizadas para aumentar a estabilidade e a reutilização enzimáticas em diversas aplicações biotecnológicas (continua).	47
Tabela 4 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis.	61
Tabela 5 – Planejamento experimental Taguchi L9.	61
Tabela 6 – Resultados dos experimentos de imobilização de ET2 em Fe ₃ O ₄ @DTPMP-GLU no planejamento experimental Taguchi L9 e razões S/R.	72
Tabela 7 – Resposta das relações S/R.	73
Tabela 8 – Análise de Variância (ANOVA).	75
Tabela 9 – Condições ótimas de imobilização da ET2.	77
Tabela 10 – Parâmetros estatísticos obtidos pelo refinamento Rietveld das amostras em estudo.	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	14
1.1	Objetivo geral	18
1.1.1	Objetivos Específicos	18
2	REVISÃO BIBLIOMÉTRICA.....	19
2.1	Introdução.....	19
2.2	Metodologia Bibliométrica	22
2.2.1	Fonte de dados.....	22
2.2.2	Análise de dados	23
2.3	Resultados e Discussão	23
2.3.1	Análise Bibliométrica	23
2.3.1.1	<i>Evolução temporal das publicações (2005 – 2025)</i>	<i>23</i>
2.3.1.2	<i>Áreas do conhecimento predominantes</i>	<i>25</i>
2.3.1.3	<i>Países mais produtivos e redes de colaboração.....</i>	<i>26</i>
2.3.1.4	<i>Autores e instituições líderes</i>	<i>28</i>
2.3.1.5	<i>Palavras-chave emergentes.....</i>	<i>29</i>
2.3.1.6	<i>Artigos mais citados</i>	<i>33</i>
2.4	Tipos de Materiais de Suporte Utilizados.....	37
2.4.1	Suportes poliméricos.....	37
2.4.2	Suportes inorgânicos.....	39
2.4.3	Suportes híbridos e nanoestruturados	40
2.4.4	Suportes funcionais/modificados.....	41
2.5	Estratégias de Funcionalização de Suportes	43
2.6	Aplicações Industriais.....	49
2.6.1	Indústria alimentícia	49
2.6.2	Indústria farmacêutica	50
2.6.3	Produção de biodiesel.....	51

2.6.4	Biorremediação.....	52
2.7	Desafios e Perspectivas Futuras.....	53
2.8	Conclusão.....	56
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	57
3.1	Materiais.....	57
3.2	Síntese sonoquímica de NPs de Fe₃O₄ funcionalizadas com DTPMP.....	57
3.3	Ativação do Fe₃O₄@DTPMP com GLU	58
3.4	Imobilização da ET2 em Fe₃O₄@DTPMP-GLU e determinação da concentração proteica	58
3.5	Determinação da atividade enzimática.....	59
3.6	Parâmetros de imobilização	59
3.7	Método Taguchi.....	60
3.8	Análise do processo de dessorção da ET2 imobilizada	62
3.9	Estabilidade operacional em ciclos de reuso	62
3.10	Carga máxima de imobilização enzimática.....	63
3.11	Estabilidade em solventes orgânicos	63
3.12	Estabilidade em pH	64
3.13	Estabilidade térmica.....	64
3.14	Estabilidade de armazenamento	64
3.15	Caracterização dos Materiais.....	65
3.15.1	Difração de raios-X (XRD)	65
3.15.2	Magnetômetro de Amostra Vibrante (VSM)	65
3.15.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	66
3.15.4	Análise Termogravimétrica (TGA)	66
3.15.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (XRF).....	66
3.15.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM)	66
3.15.7	Docking Molecular.....	67

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.1	Ativação do Fe₃O₄@DTPMP com GLU	68
4.2	Imobilização da ET2 em Fe₃O₄@DTPMP-GLU	69
4.2.1	Efeito da concentração de GLU na atividade da ET2 imobilizada	70
4.2.2	Utilização de surfactante e possível mecanismo de imobilização da ET2	71
4.3	Otimização do processo de imobilização enzimática – Planejamento experimental Taguchi.....	72
4.3.1	Análise da influência das variáveis independentes na atividade da ET2 imobilizada..	73
4.3.2	Análise da interação entre as variáveis independentes de maior influência.....	74
4.3.3	Análise da significância estatística das variáveis independentes	75
4.3.4	Condições ótimas de imobilização	76
4.4	Estabilidade da ET2 imobilizada	77
4.4.1	Análise do processo de dessorção da ET2 imobilizada.....	77
4.4.2	Estabilidade operacional em ciclos de reuso	77
4.4.3	Carga máxima de imobilização enzimática	79
4.4.4	Estabilidade em solventes orgânicos	80
4.4.5	Estabilidade em pH.....	82
4.4.6	Estabilidade térmica	83
4.4.7	Estabilidade de armazenamento	84
4.5	Caracterização dos Materiais	85
4.5.1	Espectroscopia de Difração de Raios-X (XRD).....	85
4.5.2	Magnetômetro de amostra vibrante (VSM).....	87
4.5.3	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-spectra).....	88
4.5.4	Análise Termogravimétrica (TGA).....	89
4.5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (XRF).....	90
4.5.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	91
4.5.7	Simulação de Docking Molecular	92

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
	REFERÊNCIAS.....	97
	ANEXO A - PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE LIVRO	121
	ANEXO B - PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS	122
	ANEXO C - ARTIGOS UTILIZADOS NA BASE DE DADOS DA REVISÃO	
	BIBLIOMÉTRICA.....	123

1 INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável 2030 das Nações Unidas defendem o uso de produtos químicos verdes, sustentáveis e recicláveis pelas indústrias para reduzir a poluição ambiental. Assim, as indústrias estão adotando tecnologias de biocatálise (processo verde e sustentável) para a fabricação de seus produtos (KHANRA; RAVICHANDIRAN; SWAIN, 2024). A crescente necessidade de reduzir o uso de produtos químicos, combinada com a biodegradabilidade e propriedades ecológicas das enzimas, as tornam alternativas promissoras no mercado industrial (BULLO et al., 2024).

As enzimas proteínas catalíticas que têm sido tradicionalmente utilizadas para acelerar reações químicas através da diminuição da energia de ativação das reações (BULLO et al., 2024; LI et al., 2025). Elas são consideradas biocatalisadores notáveis e valiosos na química sustentável, pois oferecem processos sustentáveis e eficientes devido à sua capacidade de atuar em condições moderadas com maior especificidade (MILOVANOVIĆ et al., 2025; MIRSALAMI; MIRSALAMI; GHODOUSIAN, 2024).

O mercado de enzimas está em constante crescimento, e as lipases, em suas formas livre e imobilizada, constituem uma parte importante desse mercado (ALI et al., 2023; BULLO et al., 2024; SABI et al., 2025). As lipases estão entre as enzimas mais utilizadas como biocatalisadores tanto na pesquisa acadêmica quanto na indústria. Fato este decorrente de sua alta estabilidade e atividade sob uma ampla gama de condições e meios. Além disso, em alguns casos, essas enzimas possuem alta seletividade e/ou especificidade regio e/ou enantio, ausência de cofatores. Somada a isto, elas têm baixa especificidade, permitindo que reconheçam um grande número de substratos diferentes (SABI et al., 2025).

Recentemente, tem havido um interesse significativo no uso da lipase líquida Eversa® Transform 2.0 (ET2), que é derivada de *Thermomyces lanuginosus* e expressa em uma cepa de *Aspergillus oryzae* (LIOW et al., 2024). A ET2 é uma lipase muito estável que está disponível comercialmente (CARBALLARES et al., 2024; SABI et al., 2025). A ET2 atraiu atenção por sua relação custo-benefício, chegando a ser 100 vezes mais barato em comparação com lipases imobilizadas como a Novozyme 435, mantendo alta atividade enzimática mesmo sob condições operacionais moderadas (LIOW et al., 2024). Ela oferece várias vantagens, incluindo alta especificidade de substrato, atividade catalítica robusta sob condições moderadas e vida útil estendida. Juntos, esses atributos posicionam a ET2 como uma candidata desejável para

aplicações industriais de larga escala (SANTOS et al., 2024).

No entanto, a aplicação de enzimas na indústria enfrenta limitações significativas, incluindo baixa estabilidade em condições operacionais, desafios de recuperação do meio de reação, limite de reutilização, solubilidade e suscetibilidade à desnaturação (MILOVANOVIĆ et al., 2025; MIRSALAMI; MIRSALAMI; GHODOUSIAN, 2024). A instabilidade das enzimas não apenas dificulta a adoção de reações enzimáticas sob condições padrão, mas também restringe a otimização do processo por meio de estratégias, como o aumento da solubilidade do reagente com co-solventes, aumento das temperaturas da reação e emprego de sistemas sem solvente (MIRSALAMI; MIRSALAMI; GHODOUSIAN, 2024).

A imobilização de enzimas é uma das estratégias mais eficazes e economicamente viáveis para os processos biotecnológicos relevantes para a biotransformação, biodiesel, indústrias alimentícias, ciência farmacêutica e diagnóstico médico (KIKANI et al., 2023). A indústria requer soluções práticas para o uso de enzimas, assim, a imobilização surge como uma forma de maior estabilidade, fácil separação das misturas de reação, reutilização por períodos prolongados, especialmente em sistemas que exigem reações químicas contínuas (ASADUZZAMAN; SALMON, 2022; KOWALCZYKIEWICZ et al., 2021). A imobilização também fornece enzimas para liberação controlada ou promove a degradação desencadeada de materiais de aprisionamento (ASADUZZAMAN; SALMON, 2022).

Na literatura, os principais mecanismos de imobilização de lipase em nanomateriais (NMs) podem ser agrupados nas seguintes categorias: reticulação, adsorção física, encapsulamento/aprisionamento, ligação covalente, ligação por afinidade e monocamadas automontadas (MILOVANOVIĆ et al., 2025). A eficácia da imobilização de enzimas em NMs é determinada por vários fatores, incluindo os métodos de imobilização, os tipos de NMs utilizados e suas propriedades físico-químicas, como tamanho de partícula, comportamento de agregação, dimensões e os agentes de acoplamento ou modificação aplicados (MILOVANOVIĆ et al., 2025; OKE et al., 2023).

Cada um desses métodos pode ser otimizado para aplicação específica e tipo de enzima, considerando fatores como estabilidade da enzima, atividade e o uso pretendido do sistema imobilizado (MILOVANOVIĆ et al., 2025). Entre esses métodos, a ligação covalente é a mais popular porque fornece maior grau de estabilização para enzimas e evita a formação de estruturas secundárias (TRIPATHI et al., 2025). Atualmente existem mais de 1300 NMs

disponíveis, enquanto a imobilização de lipase é mais comumente realizada em nanopartículas (NPs), nanotubos e membranas nanofibrosas (MILOVANOVIĆ et al., 2025).

As NPs magnéticas (NPMs) de magnetita (Fe_3O_4) são um excelente suporte para imobilizar diferentes enzimas devido à sua grande área de superfície, baixa toxicidade, facilidade de síntese, potencial paramagnético e separação simples da mistura reacional (aplicação de campo magnético externo) (MANOJ et al., 2024; MELO et al., 2024). A produção de NPs de Fe_3O_4 estequiométricas puras em larga escala levou ao desenvolvimento de várias rotas químicas, como coprecipitação, decomposição térmica, combustão, técnicas hidrotérmicas, solvotérmicas e sonoquímicas (ARORA; LEDWANI; KOMAL, 2025). Nos últimos anos, a síntese sonoquímica tem sido amplamente utilizada na fabricação de NMs devido à sua simplicidade, tempo de reação curto e condições de operação suaves (ZHANG et al., 2025b).

A abordagem sonoquímica assistida por ultrassom é ecologicamente correta e opera em condições ambientais, reduz a duração das reações e fornece um método prático e adaptável (BENIWAL et al., 2025). Ela é considerada um método rápido e fácil para criar nanoestruturas (YOUSEFZADEH; SALAVATI-NIASARI; GHANBARI, 2025). A sonoquímica se origina das condições transitórias extremas induzidas pelo ultrassom de alta intensidade, que produzem pontos quentes únicos que podem atingir altas temperaturas (acima de 5000 K), altas pressões (superiores a 1000 atmosferas) e taxas de aquecimento e resfriamento superiores a 10^{10} K s^{-1} (BENIWAL et al., 2025; HANGXUN; ZEIGER; SUSLICK, 2013; ZHANG et al., 2025b). Tais condições são distintas de outras técnicas sintéticas convencionais, como síntese hidrotérmica, pirólise de chama, química úmida ou fotoquímica (HANGXUN; ZEIGER; SUSLICK, 2013). Essas condições extremas podem acelerar a nucleação e o crescimento de NMs. Além disso, é possível obter a modulação da morfologia e do tamanho do nanomaterial ao controlar a frequência e a potência ultrassônicas, bem como a composição do sistema de reação (ZHANG et al., 2025b). Os efeitos mais notáveis são consequências da cavitação acústica dentro da solução, na qual a energia das ondas ultrassônicas causa a formação, crescimento e o colapso implosivo de bolhas (AFAQ et al., 2025; HANGXUN; ZEIGER; SUSLICK, 2013; ZHANG et al., 2025b).

Para aumentar a eficiência na utilização prática das NPMs é necessário que elas sejam superficialmente modificadas através da funcionalização (MANOJ et al., 2024; MELO et al., 2024). As NPMs exigem um revestimento de superfície biocompatível que aprimore sua

capacidade de adsorver, anexar covalentemente e se ligar a moléculas alvo (REZAEI et al., 2024). Destarte, a funcionalização permite que elas fiquem com a superfície suficientemente reativa para realizar a imobilização da enzima (MELO et al., 2024). Além disso, preserva a estrutura original das NPMs, evitando aglomeração devido à atração interpartícula, bem como evita biodegradação adicional (REZAEI et al., 2024). As NPs de ferro são facilmente oxidadas na presença de oxigênio, resultando na perda de seu magnetismo e comportamentos de dispersão, a funcionalização também contorna esse problema (HADADI; HABIBI, 2025; NGUYEN et al., 2025).

A NP de Fe_3O_4 pode ser facilmente modificada com vários grupos de revestimento de superfície, formando uma estrutura núcleo-casca (KHORAMIAN et al., 2024; KONG et al., 2025; MELO et al., 2024; NGUYEN et al., 2025). A funcionalização pode ser feita usando o ácido dietilenotriaminopenta(metileno fosfônico) (DTPMP) como a agente de cobertura. Os agentes funcionalizantes baseados em moléculas de fosfonato demonstram forte afinidade dos grupos fosfato/ácido fosfórico aos átomos de Fe na superfície dos NMs. Os derivados de fosfonato podem promover melhor estabilidade química contra variações de pH, diluições, hidrólise e oxidação (NETO et al., 2021).

Um dos métodos mais usados na imobilização de enzimas por meio de ligações covalentes envolve o uso de reagentes multifuncionais (RUSU et al., 2022). Durante a etapa de modificação para imobilização enzimática, as NPs de Fe_3O_4 são funcionalizadas com grupos especiais, como hidroxila (-OH), carboxílicos (-COOH) e amino (-NH₂), dependendo da camada de revestimento, para se ligarem às moléculas de enzima (HADADI; HABIBI, 2025; KHORAMIAN et al., 2024). A escolha do agente de reticulação é crucial para a imobilização da enzima em nanosportes, afetando a recuperação da atividade e a estabilidade operacional (LIU; HUANG; WEN, 2024).

O glutaraldeído (GLU) é um dos reagentes de reticulação mais amplamente utilizados no preparo de biocatalisadores (BARBOSA et al., 2014). O GLU é uma pequena molécula reativa capaz de penetrar na estrutura interna de enzimas, sendo frequentemente usado como reticulador devido ao seu baixo preço (HONG et al., 2021). O GLU é comumente escolhido devido à sua acessibilidade e eficácia na formação de ligações covalentes com enzimas, pois possui extremidades reativas que têm como alvo grupos funcionais específicos nas enzimas (LIU; HUANG; WEN, 2024; RUSU et al., 2022). O GLU pode reagir com diferentes grupos enzimáticos, envolvendo principalmente grupos amino primários de proteínas, embora possa

eventualmente reagir com outros grupos (tiois, fenóis e imidazóis) (BARBOSA et al., 2014).

Dessa forma, o presente estudo investiga o uso de NPs de magnetita (Fe_3O_4) funcionalizadas com DTPMP e ativadas com GLU para a imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0, trazendo uma inovação em química de superfície, visando aprimorar sua estabilidade e viabilidade para futuras aplicações industriais sustentáveis.

1.1 Objetivo geral

Realizar o estudo e a caracterização do suporte obtido pela imobilização da Lipase Eversa® Transform 2.0 (ET2) em nanopartículas magnéticas de magnetita funcionalizadas com ácido dietilenotriaminopenta(metileno fosfônico) (DTPMP) e ativadas com glutaraldeído ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$), visando aprimorar sua estabilidade e viabilidade para aplicações industriais sustentáveis.

1.1.1 Objetivos Específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ para uso como suporte enzimático;
- Ativar o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ com GLU, formando $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, e investigar as interações moleculares entre esse e a enzima ET2 por meio de estudos de docking molecular;
- Aplicar o planejamento experimental Taguchi para otimizar as condições de imobilização da ET2 no suporte funcionalizado;
- Avaliar a ET2 imobilizada quanto à sua capacidade de carga enzimática, eficiência de reutilização, resistência à dessorção e estabilidade sob diferentes condições (térmica, pH, solventes orgânicos e armazenamento);
- Caracterizar estrutural e magneticamente o suporte e a ET2 imobilizada utilizando difração de raios X (XRD), magnetômetro de amostra vibrante (VSM), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA), microscopia eletrônica de transmissão (TEM), microscopia eletrônica de varredura (SEM) e fluorescência de raios X (XRF).

2 REVISÃO BIBLIOMÉTRICA

Resumo

Nos últimos anos, uma poderosa ferramenta usada para melhorar as propriedades das enzimas têm sido o processo de imobilização, que ajuda a melhorar vários aspectos, como por exemplo, estabilidade e reutilização. No entanto, deve ser levado em conta que o tipo de material do suporte usado desempenha um papel crucial no processo de imobilização, visto que os materiais usados no suporte podem exercer forte efeito nas propriedades do sistema catalítico produzido. Uma grande variedade de materiais pode ser usada como suporte, desde materiais inorgânicos, orgânicos, ou até materiais híbridos e compósitos. Assim, pesquisas são realizadas para verificar o uso de materiais como suporte enzimático. O levantamento bibliométrico avançado auxilia na determinação dos suportes utilizados e fornece outras perspectivas sobre o tema. Assim, um levantamento foi realizado com dados fornecidos pela literatura em um período de 2005 a 2025, com o objetivo de realizar uma análise bibliométrica avançada abordando os principais estudos relacionados ao uso de suportes enzimáticos. Esse estudo destacou os principais países/regiões que realizam estudos, áreas de pesquisa que envolvem o tema, bem como tendências futuras. A análise bibliométrica mostrou um aumento acentuado nas publicações. As análises de coautoria e cocitação identificam pesquisadores-chave e redes colaborativas. A tendências de palavras-chave como "*enzyme immobilization*" e "*functionalization*" indicaram direções de pesquisa em avanço. Por fim, é possível verificar que a utilização de novos suportes é uma tendência na área da biotecnologia.

Palavras-chave: enzimas; imobilização; análise bibliométrica.

2.1 Introdução

A biocatálise é uma tecnologia fundamental que demonstra eficiência e seletividade significativas em várias reações químicas (ZHAO et al., 2025). Ela surgiu como uma estratégia central promovida pela indústria química, visando a busca por soluções sustentáveis, e assim, se alinhar aos princípios da química verde (ROBESCU; BAVARO, 2025). Em relação à catálise química, a biocatálise representa uma abordagem mais ecológica e sustentável (ZHAO et al., 2025). As enzimas são indispensáveis na biotecnologia, pois são usadas como catalisadores biológicos em diversas aplicações, incluindo desenvolvimento de produtos farmacêuticos,

biossensores, produção de produtos químicos finos, síntese de biocombustíveis, processamento de alimentos e bebidas (PRABHAKAR et al., 2025; ROBESCU; BAVARO, 2025; WANG et al., 2025b).

Os biocatalisadores se posicionam como uma alternativa promissora para aplicações industriais sustentáveis em virtude da capacidade de facilitar reações em condições amenas, ao mesmo tempo em que oferecem alta seletividade de substrato e alta eficiência catalítica (BAI; YU; DU, 2025; ROBESCU; BAVARO, 2025). As enzimas brutas naturais de microrganismos, plantas ou animais já vem sendo usadas há muito tempo em síntese química. No caso de reações não naturais para intermediários farmacêuticos, as enzimas podem ser rastreadas ou projetadas para exibir ampla especificidade de substrato e alta enantiosseletividade em experimentos bioquímicos (WANG et al., 2025b). Em ambientes aquosos, a função primária da enzima gira em torno de catalisar a hidrólise de ligações éster, resultando na formação de produtos de álcool e ácido carboxílico enquanto, em solventes orgânicos, elas demonstram a capacidade de facilitar reações reversas ou reações de transesterificação (AKRAM et al., 2025).

De acordo com o “*Market Analysis Report: Enzymes Market Size*” recentemente divulgado pela *Grand View Research*, o tamanho do mercado global de enzimas industriais foi estimado em US\$ 7.530,3 milhões em 2024 e está projetado para atingir US\$ 12.640,2 milhões até 2033, e estima-se que aumente a uma taxa de crescimento anual composta de 6,2% de 2025 a 2030 (GRAND VIEW RESEARCH, 2025). Na última década houve uma crescente demanda por enzimas eficientes, seletivas e estáveis nos níveis de pesquisa e industrial (VEGA; PLANAS; BIARNÉS, 2025). O principal propulsor do mercado de enzimas inclui tecnologias avançadas desenvolvidas para melhorar a relação custo-eficácia e a eficiência dos biocatalisadores (LIMA et al., 2025; MAGHRABY et al., 2023).

O potencial total das enzimas para aplicações industriais permanece subutilizado (ROBESCU; BAVARO, 2025). Embora as enzimas apresentem propriedades vantajosas, a aplicação prática de enzimas é frequentemente limitada por seu alto custo, que é atribuído à reutilização e estabilidade inadequadas (ZHAO et al., 2025). Os desafios da estabilidade da enzima sob condições extremas, como exposição a solventes orgânicos, surfactantes ou íons metálicos, bem como níveis de pH, altas temperaturas e altas pressões, acabam restringindo sua aplicação de forma mais ampla (BAI; YU; DU, 2025; ROBESCU; BAVARO, 2025). Além disso, outros desafios adicionais são vida útil curta e, mais criticamente, dificuldades na recuperação e reciclagem da enzima (ROBESCU; BAVARO, 2025).

As técnicas de imobilização enzimática têm sido utilizadas para diminuir as limitações do uso das enzimas (PATIL et al., 2025; ROBESCU; BAVARO, 2025; ZHAO et al., 2025). Elas surgiram com o intuito de abordar questões relacionadas à separação das enzimas da mistura de reação, recuperação das enzimas e fácil reciclagem (PATIL et al., 2025). A imobilização de enzimas oferece vantagens consideráveis, como facilidade de recuperação de enzimas, estabilidade aprimorada, bem como processamento *downstream* simplificado e operação contínua (ZHAO et al., 2025). Os métodos de imobilização podem ser tanto físicos (adsorção, ligação iônica, ligação por afinidade, encapsulamento e aprisionamento), quanto químicos (reticulação e ligação covalente). No caso da imobilização química, ela normalmente oferece estabilidade superior em comparação aos métodos físicos devido à formação de ligações mais fortes entre a enzima e o material do suporte (PRABHAKAR et al., 2025). Normalmente, os protocolos convencionais para imobilização da enzima envolvem adsorção, reticulação, ligação covalente e encapsulamento (MAGHRABY et al., 2023). As técnicas convencionais de imobilização de enzimas incluem métodos em que pode ou não ocorrer a ligação da enzima ao suporte. Assim, esses métodos podem envolver a formação de interações fracas (adsorção e interações iônicas), uma ligação química forte (interação covalente), ou incluindo a ausência de qualquer interação entre a enzima e o suporte (reticulação) (ROBESCU; BAVARO, 2025).

Os métodos de imobilização exercem impactos distintos na estabilidade e atividade enzimática (PRABHAKAR et al., 2025). Os avanços recentes na tecnologia de imobilização enzimática ajudaram a estabilizar as enzimas multissubunitárias, melhorar as propriedades catalíticas e aumentar a atividade enzimática (PATIL et al., 2025). Um sistema de imobilização eficaz deve ancorar a enzima de forma segura para evitar qualquer liberação não intencional, o que poderia contaminar os produtos e levar à perda da enzima, e assim, evitar a diminuição da atividade catalítica (ROBESCU; BAVARO, 2025). A imobilização pode ajudar a preservar a atividade da enzima por longos períodos (PRABHAKAR et al., 2025). Além disso, enzimas suficientemente estáveis no suporte podem ser reutilizadas de forma eficiente (ROBESCU; BAVARO, 2025).

O objetivo da imobilização enzimática na biocatálise moderna vai além dos benefícios tradicionais para garantir que o processo se torne comercialmente viável, oferecendo vantagens operacionais significativas, particularmente em processos contínuos (PATIL et al., 2025). Portanto, o biocatalisador pode ser projetado por meio de técnicas de imobilização (ROBESCU; BAVARO, 2025). Na última década, esforços notáveis foram destinados à exploração de

métodos inovadores de imobilização, particularmente usando materiais sólidos em escala macro e micro. Os estudos verificaram que o desempenho das enzimas imobilizadas demonstrou depender significativamente das propriedades dos materiais de suporte (ZHAO et al., 2025).

Neste contexto, o presente estudo visou explorar os avanços tecnológicos e as perspectivas no uso de materiais suporte para imobilização de enzimas por meio de um levantamento bibliométrico, destacando avanços inovadores nas pesquisas. Com a revisão bibliográfica abrangente foi possível identificar evolução temporal das publicações, principais áreas do conhecimento, autores e instituições mais produtivas, palavras-chave mais frequentes e artigos mais citados. Com o auxílio dos dados obtidos, novas perspectivas para pesquisas futuras surgem para abordar as lacunas de conhecimento sobre os materiais suporte para imobilização de enzimas.

2.2 Metodologia Bibliométrica

2.2.1 Fonte de dados

Os dados utilizados foram adquiridos na base de dados do site *Web of Science - Core Collection* (WoS), que é considerada uma plataforma confiável e de alta qualidade em publicações científicas na geração de citações bibliográficas (ZAVALA et al., 2025). Para a seleção dos dados, foram aplicados parâmetros de classificação referentes à análise bibliométrica avançada. Para acesso à plataforma, foi utilizado o *login* disponibilizado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) no sistema Capes Periódicos.

A busca inicial contou com alguns filtros. Primeiro, selecionou-se o campo “*all fields*” e adicionou-se as palavra-chave inicial “*Enzyme immobilization*”, considerando o período de 2005 a 2025, que resultou em um total de 25.108 artigos. Apenas artigos e artigos de revisão em inglês foram selecionados com o intuito de garantir a relevância dos estudos. Em seguida, dois filtros adicionais foram aplicados para refinar a busca e focar em tópicos mais específicos sobre os materiais usados como suportes usados para imobilização. No primeiro filtro foi usada a palavra-chave “*Support Materials*”, o que reduziu o número de artigos para 3.347, e por fim, foi inserido a última palavra-chave “*Functionalization*”, restringindo ainda mais as publicações, com um resultado final de 328 artigos. Esse processo de refinamento garantiu que apenas

estudos altamente relevantes para o escopo da pesquisa fossem considerados. A base serviu de suporte para todas as análises que foram realizadas.

2.2.2 Análise de dados

Três softwares foram usados para a análise quantitativa e precisa dos dados do levantamento: O VOSviewer (<http://vosviewer.com>), o CiteSpace (<https://citespace.podia.com>) e o pacote R do bibliometrix (<https://www.bibliometrix.org/>). Com base no acervo central do banco de dados WoS, foi utilizada de forma abrangente as vantagens dos softwares VOSviewer e CiteSpace para realizar análises bibliométricas, analisar e resumir de forma sistemática e visual a literatura sobre os materiais suporte para imobilização de enzimas, e explorar o *status* da pesquisa (CHENG et al., 2021). O CiteSpace ajudou a projetar o futuro da pesquisa em áreas de interesse, com base nas palavras-chave e *clusters* gerados (CHEN; ZHANG; LI, 2022). O pacote R do bibliometrix foi crucial para análise bibliométrica, pois facilita a extração, limpeza e análise de dados, criando gráficos e mapas interativos, que melhoram a interpretação dos dados, tornando-os mais acessíveis e intuitivos (ARIA; CUCCURULLO, 2017).

2.3 Resultados e Discussão

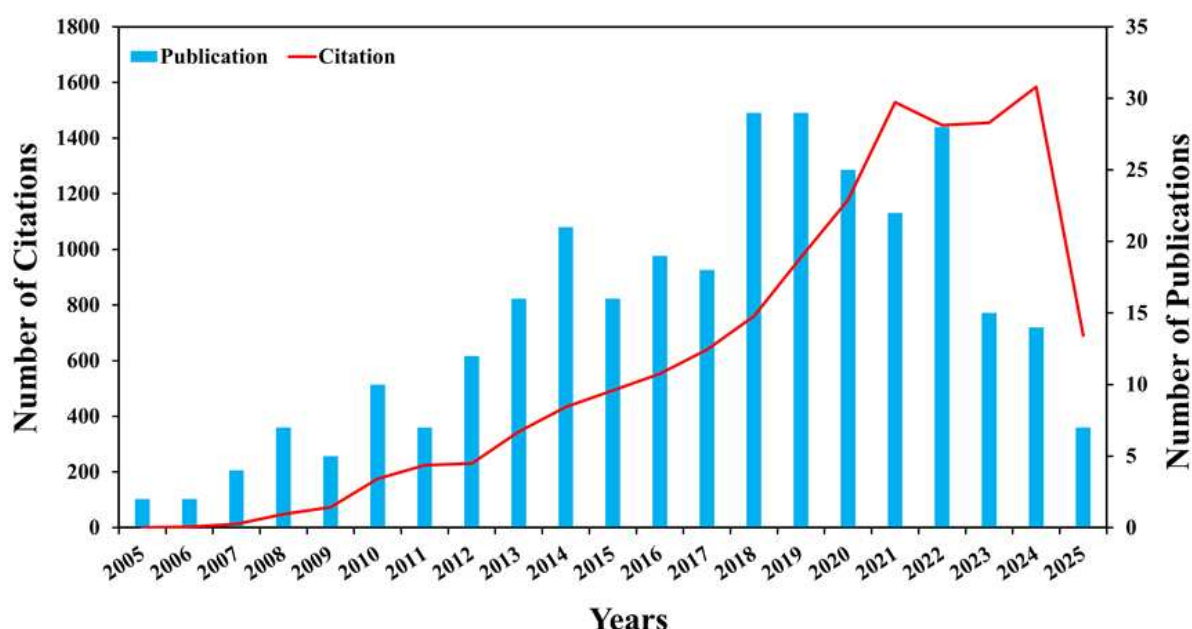
2.3.1 Análise Bibliométrica

2.3.1.1 Evolução temporal das publicações (2005 – 2025)

A análise das acelerações que os estudos demonstraram ao longo do tempo é um ponto crucial para refletir as tendências na pesquisa bibliográfica (MUTLU AVINÇ; YILDIZ, 2025). A Figura 1 combina barras e linhas para ilustrar a evolução anual do número de publicações e citações em estudos relacionados aos suportes para imobilização de enzimas, abrangendo o período de 2005 a 2025. As barras em azul claro representam o número de publicações, enquanto a linha vermelha mostra o número de citações. É possível visualizar um aumento na produção acadêmica a partir de 2008, com flutuações até 2017, com um declínio acentuado na produção de publicações a partir de 2023. Uma possível razão para a tendência de oscilações nas publicações pode ser atribuída a variações na priorização de pesquisas, mudanças na

disponibilidade de financiamento ou saturação temporária do tópico, levando a uma reorientação dos esforços de pesquisa para outras áreas ou uma diminuição temporária no número de publicações. Por outro lado, o declínio nas publicações após 2022, apesar do alto número de citações, pode indicar um potencial diminuição na relevância ou no impacto de publicações mais recentes, sugerindo um ponto de saturação na área, indicando que as questões centrais já foram extensivamente exploradas.

Figura 1 – Produção científica anual e citações indexadas no *Web of Science* de 2005 a 2025, relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dois picos notáveis em 2018 e 2019, que marcam o maior volume de produção de publicações dentro do período analisado. Os picos mais intensos podem ser atribuídos a vários fatores, como o estímulo por avanços significativos na área, aumento do financiamento de pesquisa ou interesse renovado no assunto devido a eventos globais ou descobertas relevantes. Além disso, podem estar associados a um aumento na colaboração internacional, maior acesso a tecnologias de pesquisa ou à necessidade urgente de abordar desafios que exigem investigação científica mais aprofundada.

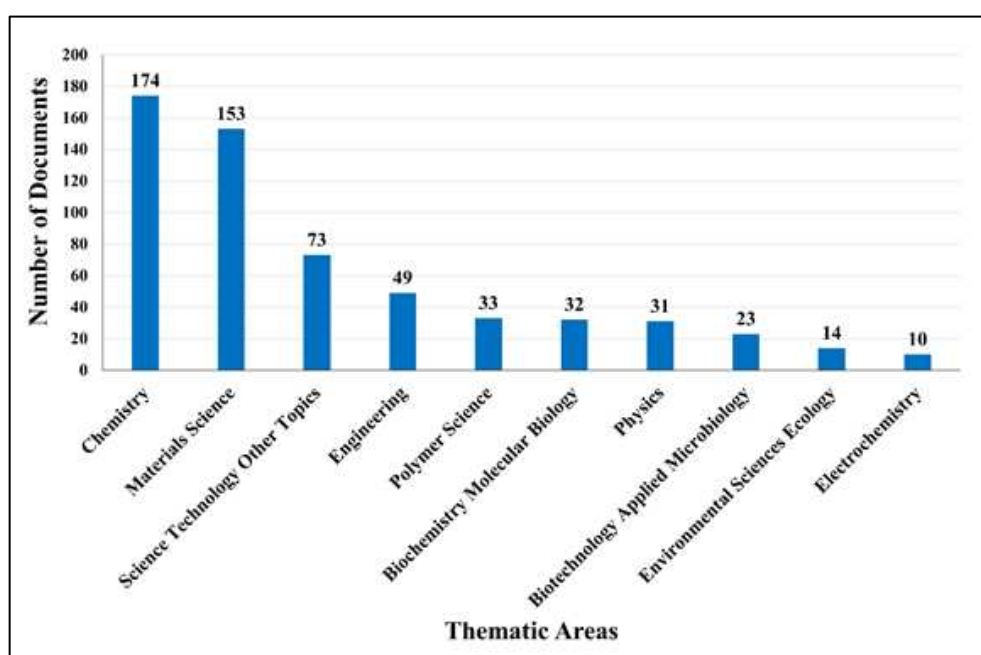
Um aumento constante foi observado nas citações ao longo dos anos, com crescimento significativo até 2021. Os anos de 2021 e 2024 tiveram o maior número de citações, 1529 e 1584, respectivamente. Esses picos sugerem que os artigos publicados nesses anos foram

particularmente influentes e amplamente referenciados em pesquisas subsequentes, ressaltando seu impacto significativo na comunidade acadêmica. O crescimento até 2019 coincide com a popularização dos suportes magnéticos e maior financiamento em biotecnologia. O declínio após 2023 não representa perda de relevância, mas sim uma transição temática, possivelmente associada à saturação de suportes clássicos, com migração da pesquisa para materiais mais inovadores, como MOFs e COFs.

2.3.1.2 Áreas do conhecimento predominantes

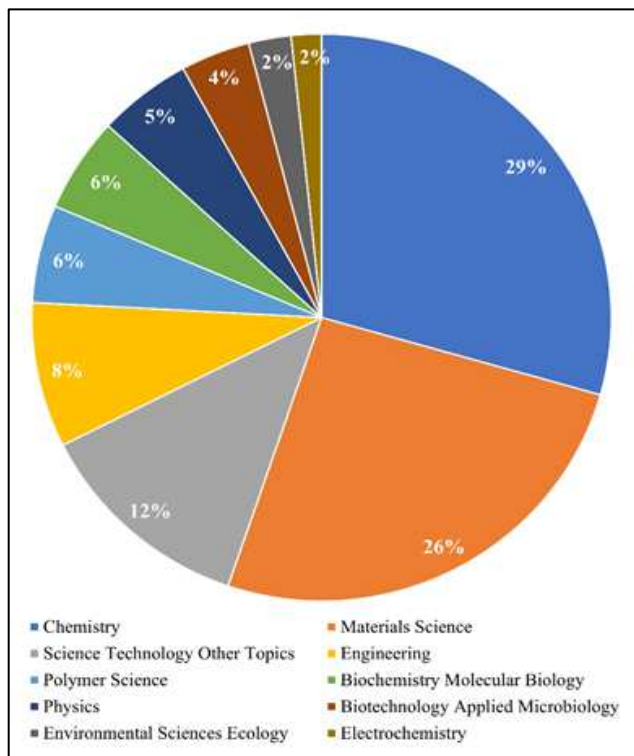
A Figura 2 ilustra a distribuição de artigos publicados em diferentes áreas de pesquisa no desenvolvimento de matérias suporte para imobilização de enzimas. A análise revela que a categoria “Química” se destaca como a área mais predominante, com 174 publicações, representando 29 % dos artigos na base de dados selecionada, como exibe a Figura 3, indicando o papel significativo dos avanços na área de química. Como pode ser visto nas Figuras 2 e 3, a pesquisa de materiais suporte para imobilização de enzimas possui uma distribuição com abordagem multidisciplinar, mostrando que a diversidade de áreas não apenas ressalta os diferentes tipos de setores que usam enzimas imobilizadas, mas abrindo oportunidades promissoras para o desenvolvimento de novos suportes para imobilização.

Figura 2 – As 10 principais áreas de pesquisa relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – Distribuição percentual de registros das 10 principais áreas de pesquisa relacionadas aos suportes para imobilização de enzimas.

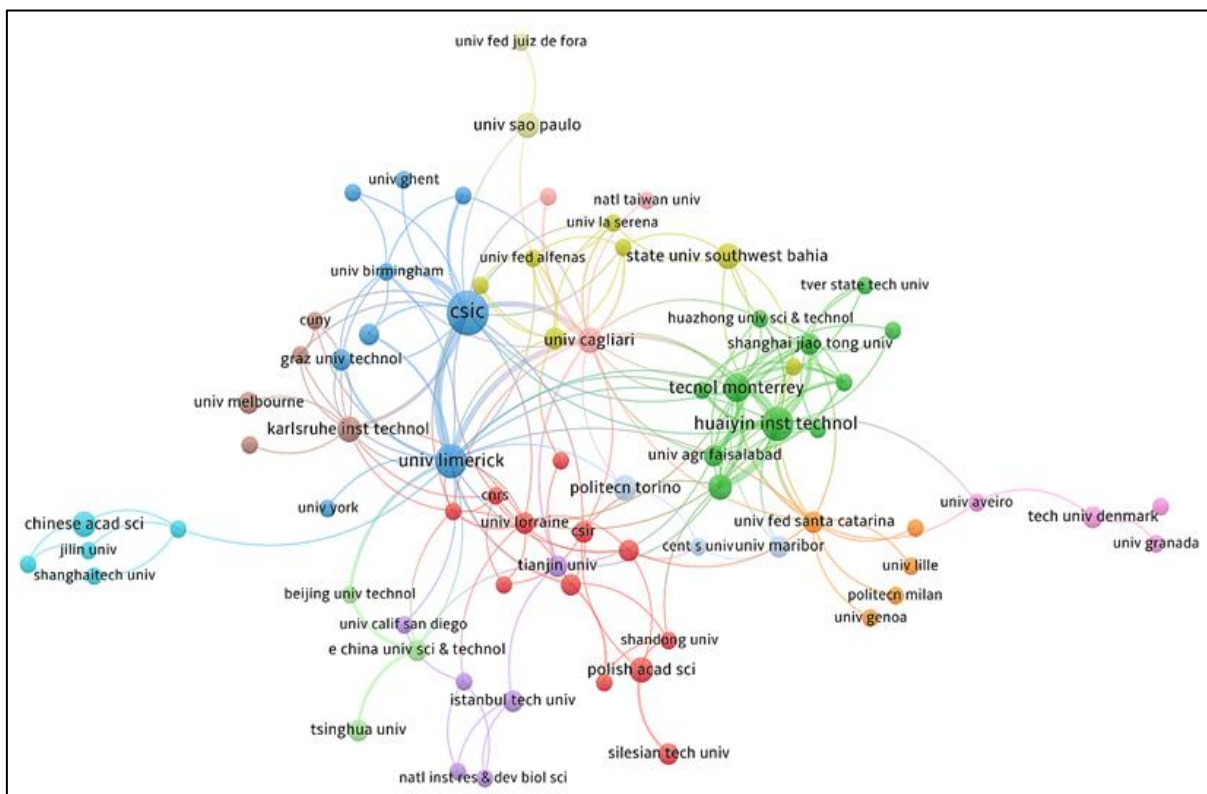


Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.3 Países mais produtivos e redes de colaboração

A análise do banco de dados também fornece informações sobre a região/país de origem indicado pelos autores correspondentes dos artigos publicados. Na Figura 4, podemos ver uma rede de *clusters* coloridos formados por diferentes países, agrupados de acordo com seu grau de colaboração e conectados por linhas, de 2014 a 2020. Dos 59 países, 44 foram incluídas por apresentaram pelo menos 2 publicações. Entre todos esses países, representados por “nós”, um nó se destaca devido ao seu tamanho e ao número de conexões com outros países. Este país é a China, que obteve o maior número de publicações (53 publicações, 11,4% do total) e o maior número de citações (2.295). A USA em segundo lugar (39 publicações e 2.082 citações) e a Alemanha em terceiro lugar (30 publicações e 615 citações). O Brasil também possui uma visibilidade, embora ocupe a sexta posição, com 23 publicações, possui 1.023 citações. Os EUA e a China dominam as publicações, mas o Brasil ganha destaque, principalmente em pesquisas aplicadas em energia e biocombustíveis, o que reflete políticas nacionais voltadas à bioeconomia.

Figura 5 – Mapa de visualização de rede relacionado à colaboração entre instituições mais produtivas.

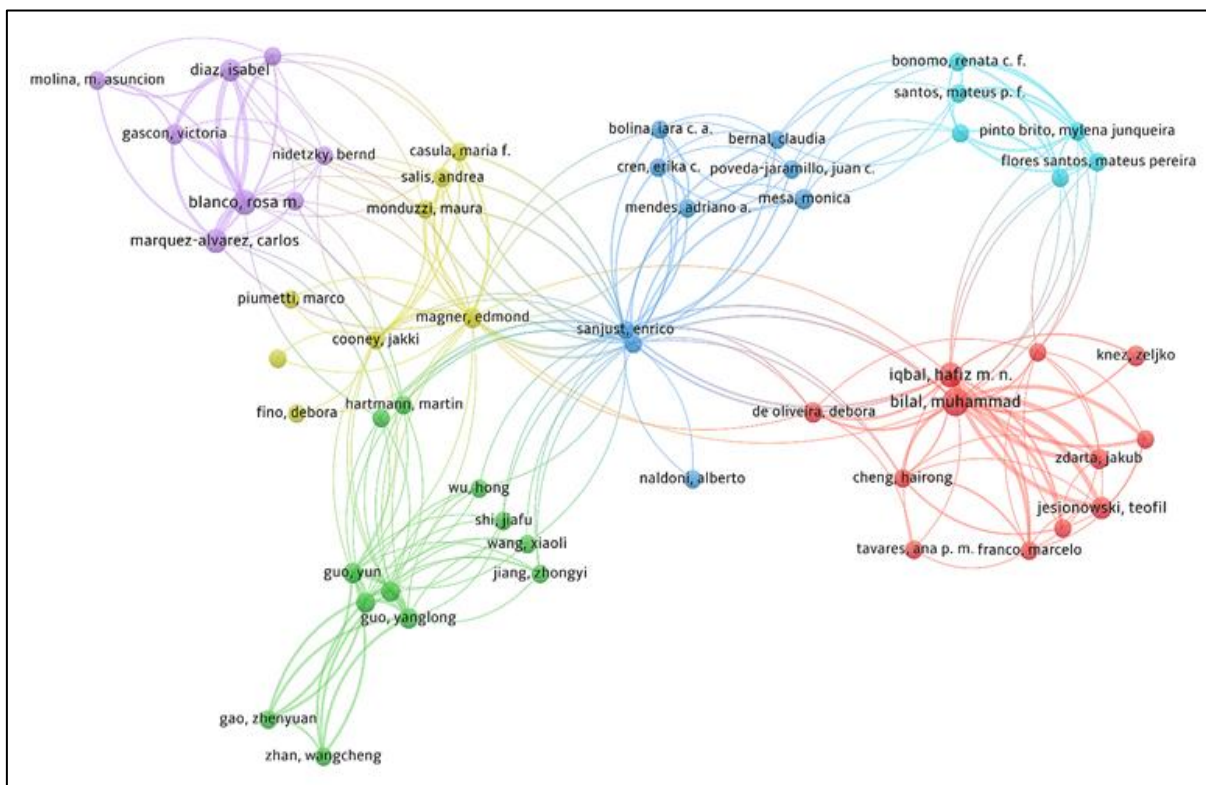


Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.4 Autores e instituições líderes

A Figura 6 expõe os autores com maior número de publicações, onde dos 1652 autores, 102 foram citados pelo menos duas vezes. Entre eles, os dois autores mais citados foram Muhammad Bilal (905 citações e 4 publicações), Edmond Magner (973 citações e 3 publicações) e Hafiz M. N. Iqbal (748 citações e 3 publicações). Embora estes autores tenham tido poucas publicações, eles tiveram um número elevado de citações.

No caso dos autores Sarah Hudson, Jakki Cooney e Edmond Magner, possuem o maior número de citações com apenas uma publicação, a revisão de 2008 intitulada “*Proteins in Mesoporous Silicates*”. O autor Edmond Magner também se destaca por possuir autoria única, no artigo de revisão de 2013 intitulado “*Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials*”.

Figura 6 – Visualização em *cluster* da referência de cocitação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.3.1.5 Palavras-chave emergentes

As Palavras-chave garantem a compreensão geral de um tópico de pesquisa e seu conteúdo. Assim, ao analisar palavras-chave de alta frequência tópicos importantes e atuais no campo de suportes para imobilização de enzimas são refletidos (MUTLU AVINÇ; YILDIZ, 2025). A Tabela 1 mostra as 20 palavras-chave mais frequentemente envolvidas no campo dos suportes para imobilização de enzimas.

A palavra-chave mais importante mencionada no levantamento bibliométrico foi “*enzyme immobilization*” com 117 ocorrências e força total do link 435. A alta força total do link dessas palavras-chave resalta sua centralidade e interconexão na rede de estudo, refletindo um forte foco no desenvolvimento de suportes para imobilização de enzimas.

Tabela 1 – As 20 palavras-chave mais relevantes na área de materiais como suporte para imobilização enzimática.

Rank	Palavras-chave	NOs	FTL	Rank	Palavras-chave	NOs	FTL
1	<i>enzyme immobilization</i>	117	435	11	<i>covalent immobilization</i>	27	115
2	<i>functionalization</i>	95	344	12	<i>mesoporous silica</i>	27	123
3	<i>immobilization</i>	94	354	13	<i>laccase</i>	26	118
4	<i>adsorption</i>	57	226	14	<i>glucose-oxidase</i>	23	92
5	<i>nanoparticles</i>	46	182	15	<i>magnetic nanoparticles</i>	23	95
6	<i>stability</i>	46	220	16	<i>surface</i>	23	85
7	<i>lipase</i>	45	191	17	<i>sba-15</i>	22	95
8	<i>enzyme</i>	38	153	18	<i>support</i>	22	101
9	<i>enzymes</i>	36	147	19	<i>surface functionalization</i>	21	82
10	<i>silica</i>	32	144	20	<i>carbon nanotubes</i>	20	80

Note: NOs = número de ocorrências; TLS = força total do link.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A rede de co-ocorrência de palavras-chave foi construída para verificar quais são as palavras-chave que mais ocorrem e como estão relacionadas (DE MORAES; KAFURE, 2020). A resposta desta questão é ressaltada na Figura 7, com os resultados de uma análise de rede conduzida com o VOSviewer©, identificando cinco *clusters* principais. A análise destaca um *cluster* verde crítico que é central para a rede. Esse *cluster* é ancorado pela palavra-chave “*enzyme immobilization*”, que é o primeiro termo mais citado na análise (Tabela 1) e está intimamente ligada a outros termos-chave, como “*adsorption*”, “*stability*” e “*lipase*”, indicando o foco principal do estudo. Numerosos estudos exploram diferentes tipos imobilização enzimática. Entre as possibilidades estudadas, destaca-se a adsorção. A adsorção é uma abordagem clássica da imobilização enzimática, que apesar de gerar interações fracas, é a técnica de imobilização reversível mais fácil e menos invasiva. A imobilização enzimática aborda desafios-chave como estabilidade enzimática limitada. As principais descobertas destacam o impacto da imobilização na melhoria do desempenho enzimático e seu papel na

que novos artigos aparecem *online* quase todos os dias (ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION, 2025).

O artigo aborda uma revisão que discute a aplicação de silicatos mesoporosos (MPS) funcionalizados, ordenados e de poros grandes para imobilizar proteínas para biocatálise. A revisão conclui que considerando os fatores influentes na geração de um novo biocatalisador de proteína imobilizada e a disponibilidade de MPS com grupos funcionais de superfície que podem ser adaptados, existe um potencial significativo para o desenvolvimento de biocatalisadores estáveis e ativos.

O segundo artigo mais citado, é o de Zucca e Sanjust (2014), cujo título é “*Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms*”, foi publicado no *MOLECULES*, um jornal publicado pelo MDPI (*Multidisciplinary Digital Publishing Institute* - Instituto Multidisciplinar de Publicação Digital), com um total de 368 citações e uma média de 30,67 citações por ano até o momento da pesquisa bibliométrica. Ele é um periódico internacional de química, que se concentra em todos os aspectos da química e da ciência dos materiais. A revista é publicada quinzenalmente *online* pelo MDPI (MDPI, 2025).

O artigo traz uma revisão sobre os suportes inorgânicos mais comuns para imobilização covalente de enzimas, com foco particular em suas vantagens e desvantagens em termos de cargas enzimáticas, estabilidade operacional, adsorção indesejada e custos. Além disso, discute os mecanismos e métodos para imobilização covalente, com foco nas abordagens de ativação mais difundidas.

A revisão conclui que suportes inorgânicos são destaque na área de tecnologia enzimática devido a algumas características peculiares, permitindo a incomparável aplicação. Os autores ressaltam todas as características dos suportes e dos métodos de funcionalização/ativação devem ser avaliados cuidadosamente para obtenção de todo o potencial da imobilização covalente (ZUCCA; SANJUST, 2014).

Tabela 2 – Os dez trabalhos mais citados na área de materiais como suporte para imobilização enzimática.

Rank	Título	Autores	Jornal	Ano de Publicação	Total de citações	Citação média por ano	Referência
1	<i>Proteins in Mesoporous Silicates</i>	Hudson, Sarah; Cooney, Jakki; Magner, Edmond	<i>ANGEWANDTE CHEMIE- INTERNATIONAL EDITION</i>	2008	594	33	(HUDSON; COONEY; MAGNER, 2008)
2	<i>Inorganic Materials as Supports for Covalent Enzyme Immobilization: Methods and Mechanisms</i>	Zucca, Paolo; Sanjust, Enrico	<i>MOLECULES</i>	2014	368	30,67	(ZUCCA; SANJUST, 2014)
3	<i>Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review</i>	Bilal, Muhammad; Zhao, Yuping; Rasheed, Tahir; Iqbal, Hafiz M. N.	<i>INTERNATIONAL JOURNAL OF BIOLOGICAL MACROMOLECULES</i>	2018	350	43,75	(BILAL et al., 2018)
4	<i>Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends</i>	Walcarius, Alain; Minteer, Shelley D.; Wang, Joseph; Lin, Yuehe; Merkoci, Arben	<i>JOURNAL OF MATERIALS CHEMISTRY B</i>	2013	307	23,62	(WALCARIUS et al., 2013)
5	<i>Metal-Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials</i>	Wang, Xiaoliang; Lan, Pui Ching; Ma, Shengqian	<i>ACS CENTRAL SCIENCE</i>	2020	279	46,5	(WANG; LAN; MA, 2020)
6	<i>Immobilization of enzymes on mesoporous silicate materials</i>	Magner, Edmond	<i>ACS NANO</i>	2013	279	21,46	(MAGNER, 2013)

7	<i>Metal-Organic Frameworks for Cell and Virus Biology: A Perspective</i>	Ricco, Raffaele; Liang, Weibin; Li, Shaobo; Gassensmith, Jeremiah J.; Caruso, Frank; Doonan, Christian; Falcaro, Paolo	<i>MOLECULES</i>	2018	239	29,88	(RICCÒ et al., 2018)
8	<i>Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization</i>	Zucca, Paolo; Fernandez-Lafuente, Roberto; Sanjust, Enrico	<i>JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B-ENZYMATIC</i>	2016	226	22,6	(ZUCCA; FERNANDEZ-LAFUENTE; SANJUST, 2016)
9	<i>Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization</i>	Cipolatti, Eliane P.; Silva, Maria Jose A.; Klein, Manuela; Feddern, Vivian; Feltes, Maria Manuela C.; Vladimir Oliveira, J.; Ninow, Jorge L.; de Oliveira, Debora	<i>CRITICAL REVIEWS IN BIOTECHNOLOGY</i>	2014	221	18,42	(CIPOLATTI et al., 2014)
10	<i>Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design</i>	Bilal, Muhammad; Asgher, Muhammad; Cheng, Hairong; Yan, Yunjun; Iqbal, Hafiz M. N.	<i>MATERIALS SCIENCE AND ENGINEERING C-MATERIALS FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS</i>	2019	213	30,43	(BILAL et al., 2019a)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora o artigo de Miriam Daniel e colaboradores publicado em 2022, cujo título é “*MOF based electrochemical sensors for the detection of physiologically relevant biomolecules: An overview*”, não esteja entre os 10 mais citados, foi o que apresentou o maior número de citações em 2025, um total de 42 citações. Eles discutem de forma abrangente as várias propriedades e abordagens notáveis para funcionalização de estruturas metal-orgânicas (MOFs) utilizadas para detecção eletroquímica seletiva de biomoléculas fisiologicamente importantes. Dentre as estratégias sintéticas para modificação de MOFs é destacado seu uso na imobilização de enzimas para detectar e amplificar os sinais elétricos para biomoléculas alvo. Os autores concluem que a versatilidade sintética dos MOFs permite adaptar características físicas desejáveis, como área de superfície e porosidade, que têm atraído muita atenção e interesse de pesquisadores (DANIEL et al., 2022).

Os outros artigos listados na Tabela 2 também são de revisão, mostrando a importância deste tipo de artigo na área de pesquisa. Os artigos de revisão são frequentemente muito citados, pois representam ponto de partida ideal para os pesquisadores, trazendo uma síntese e analisando a literatura existente sobre um tema, e assim, fornecem uma visão geral do conhecimento passado e atual, facilitando o aprofundamento na área de pesquisa.

2.4 Tipos de Materiais de Suporte Utilizados

2.4.1 Suportes poliméricos

A estratégia de imobilização enzimática é frequentemente usada em biotecnologia para melhorar a estabilidade, reutilização e eficácia de enzimas em processos industriais (CIPOLATTI et al., 2016). A seleção do suporte adequado é essencial para o desenvolvimento desta técnica. Os polímeros, sejam eles naturais ou sintéticos, são os materiais mais utilizados devido à sua versatilidade e compatibilidade com diversos métodos de imobilização (ASADUZZAMAN; SALMON, 2022).

O alginato de sódio destaca-se entre os polímeros naturais por sua capacidade de formar géis moles por meio de gelificação iônica na presença de íons divalentes, como o cálcio (WENG et al., 2023b). Essa característica permite o encapsulamento eficaz de enzimas, protegendo-as de condições desfavoráveis e preservando sua capacidade catalítica (ZDARTA et al., 2018).

Além disso, o alginato é um material biocompatível e biodegradável, com estrutura porosa que favorece a difusão de substratos e produtos, sendo amplamente utilizado em aplicações industriais e biomédicas (LI; WEI; XUE, 2021).

A quitosana, produzida a partir da desacetilação da quitina encontrada no exoesqueleto de crustáceos, é outro polímero natural amplamente utilizado para a imobilização de enzimas (ZEYADI; ALMULAIKY, 2023). Sua composição possui grupos amino que podem ser facilmente alterados quimicamente, possibilitando diferentes tipos de ligação enzimática, como adsorção, ligação covalente e encapsulamento. Além disso, a quitosana possui características antimicrobianas, biodegradabilidade e afinidade por proteínas, o que amplia sua utilização em diversas áreas, como nas indústrias alimentícia e farmacêutica (RIBEIRO et al., 2021).

Na área de polímeros sintéticos, a poliacrilamida (PAAm) é frequentemente utilizada devido à sua estrutura tridimensional estável e compatibilidade com diversos métodos de imobilização (MARQUES; YAMANAKA, 2008; QUEISSADA; DA SILVA, 2020). Apesar da toxicidade do monômero de acrilamida, o polímero reticulado é estável e inerte, tornando-o adequado para usos controlados (CHENG et al., 2024). A capacidade da poliacrilamida de ser funcionalizada com grupos carboxílicos ou amina facilita a ligação covalente de enzimas, melhorando sua estabilidade operacional (FURLANI et al., 2020; NEIRA; JEEAWOODY; HERR, 2020).

O álcool polivinílico (PVA) é outro material sintético notável, que se distingue por sua hidrofilicidade, ausência de toxicidade e alta estabilidade em meio aquoso (GUAJARDO, 2023). O PVA pode ser moldado de diversas maneiras, seja em filmes, géis ou esferas, e sua estrutura permite a inserção de grupos funcionais por meio de reações com agentes de reticulação, como o GLU (GUAJARDO; AHUMADA; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, 2020). Pesquisas recentes indicam que a fixação de enzimas em suportes de PVA leva a altos rendimentos catalíticos e excelente reutilização, destacando seu potencial (GUAJARDO, 2023).

Há uma tendência crescente para a criação de suportes híbridos que combinam polímeros naturais e sintéticos, com o objetivo de combinar as vantagens de ambos os tipos de materiais (AMOUPOUR et al., 2024). Por exemplo, esferas de PVA/alginato revestidas com quitosana apresentaram alta eficácia de imobilização e notável estabilidade térmica e operacional ao longo do tempo (TOSCANO et al., 2014). Portanto, a seleção do suporte polimérico apropriado deve levar em consideração aspectos como a natureza da enzima, as

condições operacionais do processo e o custo de produção (YANG et al., 2023b). A inovação constante na transformação e união desses materiais tem expandido os usos da imobilização enzimática, impulsionando melhorias na eficiência e sustentabilidade em vários segmentos da indústria (QUEISSADA; DA SILVA, 2020).

2.4.2 Suportes inorgânicos

Materiais inorgânicos, como sílica, Fe_3O_4 , ZrO_2 e óxidos metálicos, são frequentemente utilizados por sua estabilidade térmica e química, resistência mecânica e simplicidade na funcionalização. A sílica é uma das superfícies inorgânicas mais amplamente utilizadas para fixação de enzimas (ZDARTA et al., 2018). Sua superfície extensa e estrutura porosa permitem a adsorção eficaz de enzimas, enquanto os grupos hidroxila presentes em sua superfície simplificam a alteração química para formar ligações covalentes com as enzimas (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; ZDARTA; JESIONOWSKI, 2018). A imobilização de enzimas em suportes de sílica, como lipases, preserva alta atividade catalítica e estabilidade térmica e de pH (ZDARTA et al., 2018; ZUCCA; SANJUST, 2014).

A Fe_3O_4 é frequentemente utilizada como suporte devido às suas características magnéticas, que permitem a separação simples do biocatalisador do meio de reação por meio da aplicação de um campo magnético externo (MELO et al., 2024). Além disso, a magnetita possui uma grande área superficial e pode ser funcionalizada com diversos grupos químicos, como amino ou carboxila, para simplificar a ligação entre enzimas (BEZERRA et al., 2020; KHOABI et al., 2015). Estudos destacam a eficácia das nanopartículas de magnetita na imobilização de enzimas, como a Transformada Eversa, gerando biocatalisadores altamente eficazes na produção de ésteres (SANTOS et al., 2024).

A zircônia (ZrO_2) é um material cerâmico com alta resistência térmica e química, o que o torna adequado para uso em ambientes agressivos (ALPTEKİN, 2019). A superfície pode ser modificada para simplificar a imobilização enzimática, e pesquisas indicam que biocatalisadores à base de zircônia apresentam características únicas em relação aos suportes de sílica convencionais, como maior densidade e resistência química superior (ALPTEKİN, 2022; ALPTEKİN, 2019).

Outros óxidos metálicos, como titânio e alumínio, também são utilizados como suportes

para imobilização enzimática (RAMLEE et al., 2022). Esses compostos apresentam alta estabilidade térmica e química, além de superfícies que podem ser funcionalizadas para simplificar a ligação enzimática (PARANDI et al., 2023). Por exemplo, a alumina (Al_2O_3) possui superfícies com grupos hidroxila que permitem alteração química e ligação covalente de enzimas, sendo utilizada na imobilização de diversas enzimas, como lipases e uréases (AGGARWAL; IKRAM, 2025; CARDOSO; DE MORAES; CASS, 2009).

Suportes inorgânicos, como sílica, Fe_3O_4 , ZrO_2 e outros óxidos metálicos, proporcionam benefícios notáveis na imobilização enzimática, graças à sua estabilidade, facilidade de modificação e compatibilidade com diversos métodos de imobilização (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; NGHIEM; JESIONOWSKI, 2021). Isso auxilia na criação de biocatalisadores eficazes e reutilizáveis para uso em processos industriais (ZDARTA et al., 2018).

2.4.3 Suportes híbridos e nanoestruturados

A imobilização de enzimas em NMs e suportes nanoestruturados tem sido apontada como uma alternativa promissora para melhorar a estabilidade, a atividade e a reutilização de biocatalisadores em diversas aplicações industriais e ambientais (INTISAR et al., 2022). Assim, a integração da nanotecnologia na imobilização enzimática oferece vantagens significativas em relação aos métodos tradicionais, principalmente devido às propriedades únicas dos NMs, como alta área superficial, porosidade controlada e facilidade de funcionalização da superfície (MEENA et al., 2021). Diversos NMs têm sido investigados para uso como suportes para imobilização enzimática, incluindo nanocompósitos e estruturas metal-orgânicas (MOFs) (BILAL; IQBAL, 2019).

Nanocompósitos são materiais híbridos feitos a partir da combinação de dois ou mais componentes em escala nanométrica (SHARON; NANDGAVKAR; SHARON, 2017), geralmente envolvendo uma matriz polimérica, cerâmica ou metálica que possui NPs inorgânicas incorporadas em sua estrutura (MUSA et al., 2025) que foram aplicadas com sucesso na imobilização de lipases (ASMAT; HUSAIN; AZAM, 2017), lacases (QIU et al., 2019) e peroxidases (ALI et al., 2018).

Os MOFs são caracterizadas como redes altamente organizadas formadas pela coordenação de íons metálicos com ligantes orgânicos, cristalinos e altamente porosos (BILAL

et al., 2019b). Enzimas encapsulantes na matriz MOF podem protegê-las de agentes desnaturantes, preservando sua atividade catalítica (GKANIATSOU et al., 2018). Além disso, os grupos funcionais nos ligantes orgânicos podem ser modificados para otimizar sua interação com enzimas específicas (ROGACKA; LABUS, 2024). Os NMs, como o óxido de zinco (ZnO), têm atraído ainda mais atenção devido à sua biocompatibilidade e altas taxas de transferência de elétrons, tornando-os candidatos adequados para biossensores potenciométricos, onde enzimas imobilizadas podem detectar com precisão analitos como o colesterol (DING; QIN, 2020).

Materiais nanoestruturados, como suportes à base de carbono e estruturas metal-orgânicas, oferecem altas áreas superficiais e propriedades ajustáveis que podem facilitar a imobilização enzimática eficaz (FAHIM et al., 2025). As dimensões em nanoescala da estrutura nanocompósita permitem diferentes modos de ligação com a enzima, o que pode ajudar a manter sua conformação nativa e a atividade nativa durante a etapa de imobilização. Essa preservação é fundamental para garantir que as enzimas mantenham suas propriedades catalíticas após a imobilização (LALAOUI et al., 2016).

Portanto, suportes híbridos e nanoestruturados oferecem caminhos promissores para a imobilização enzimática, aumentando significativamente a estabilidade, a eficiência e a reutilização. À medida que a pesquisa evolui, o aproveitamento de diversos NMs e compósitos continuará a transformar a biocatálise, tornando-a mais viável para aplicações industriais. Esforços futuros devem visar o aprimoramento dessas tecnologias, estabelecendo protocolos mais robustos para a estabilização enzimática, além de abordar a escalabilidade e a viabilidade econômica.

2.4.4 Suportes funcionais/modificados

Os grupos amino são geralmente grupos funcionais de uma imobilização enzimática, pois produzem interações estáveis com os resíduos de ácido carboxílico na enzima. Os suportes modificados carboxilados, como a quitosana, explicam sua capacidade de imobilização para se ligar covalentemente à enzima, produzindo, por meio da carboxilação, um exemplo de quitosana que contribui para a imobilização da enzima em condições covalentes suportadas.

Em geral, os mecanismos de reação baseiam-se principalmente na formação de ligações amida entre a funcionalidade amino do suporte e os grupos carboxila da enzima, o que

geralmente define o complexo e permite a estabilização da atividade enzimática em condições operacionais (NGUYEN; KIM, 2017; SIMOVIĆ et al., 2019). Estudos recentes mostraram que o uso de transportadores primários amino-funcionalizados levou a interações mais favoráveis com enzimas como a β -galactosidase, resultando em uma maior retenção da atividade enzimática em comparação com outros métodos (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; SIMOVIĆ et al., 2019).

Da mesma forma, grupos carboxílicos no suporte facilitam a ligação covalente de enzimas por meio da formação de ligações amida estáveis com grupos amino na superfície da enzima. Por exemplo, pesquisas demonstraram que suportes de esferas carboxiladas podem se ligar eficazmente a enzimas, garantindo a manutenção da atividade e da estabilidade, especialmente quando potencializados com métodos de imobilização covalente (MURPHY et al., 2020; PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2023). Grupos de ácido carboxílico também podem auxiliar na modulação da hidrofiliicidade do suporte, o que é benéfico para a carga e a atividade enzimáticas (DICHARANTE; MILANI; METRANGOLO, 2018). Além disso, suportes projetados com uma superfície rica em grupos carboxílicos têm sido utilizados em aplicações de biossensores devido à sua maior capacidade de carga enzimática e baixo vazamento de proteínas (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2023).

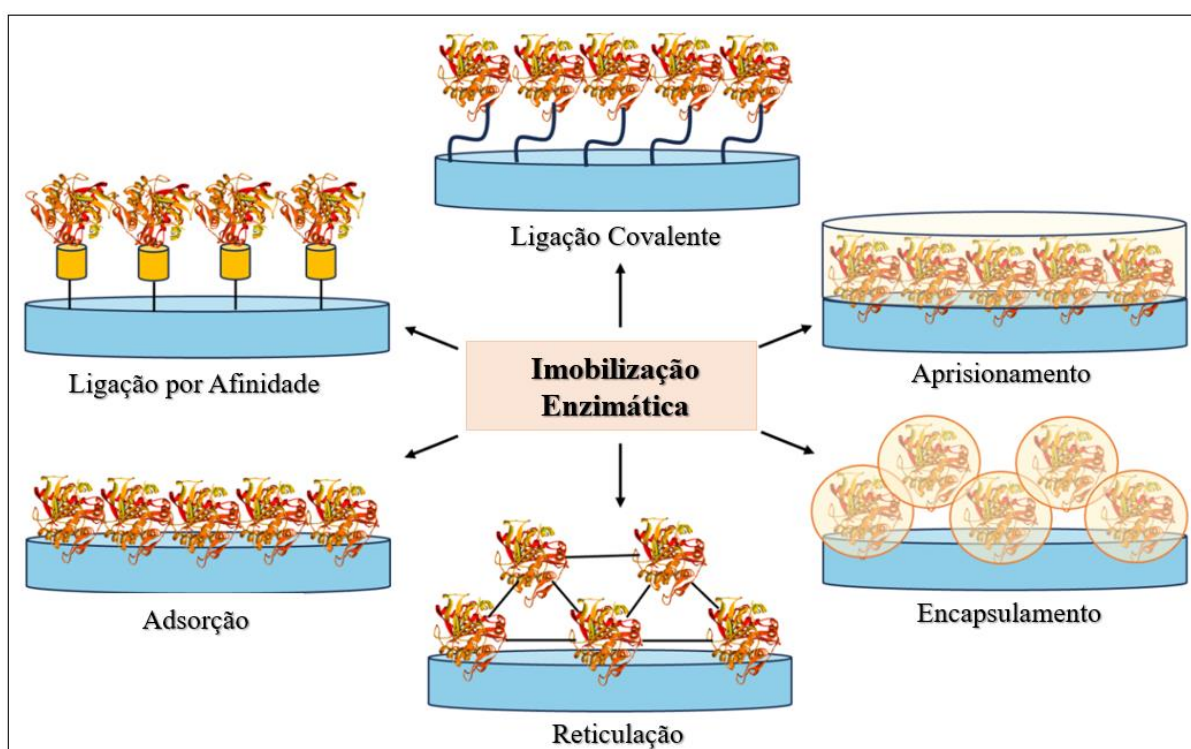
Grupos fosfonatos representam outra classe de suportes funcionalizados que oferecem capacidades de interação únicas. Enzimas foram imobilizadas com sucesso em suportes de sílica e polímeros revestidos com fosfolipídios aminofuncionalizados. Essa abordagem levou a uma melhor estabilidade enzimática e desempenho catalítico em comparação aos métodos tradicionais. As funcionalidades fosfonatos melhoram a ligação enzimática, aumentando as interações com múltiplos sítios de ligação, ajudando assim a manter a atividade enzimática sob condições ambientais variáveis (DICHARANTE; MILANI; METRANGOLO, 2018).

Assim, a integração de grupos amino, carboxila e fosfonato no desenvolvimento de suportes funcionalizados para imobilização enzimática demonstra um avanço significativo em aplicações biotecnológicas. Esses grupos não apenas aumentam a estabilidade e a atividade enzimática, mas também fornecem mecanismos de interação versáteis que podem ser adaptados para processos enzimáticos específicos. O crescente corpo de pesquisas enfatiza a necessidade de selecionar suportes apropriados com base nos resultados catalíticos desejados e nas condições operacionais, com a exploração contínua de novas estratégias de funcionalização para otimizar ainda mais o desempenho enzimático.

2.5 Estratégias de Funcionalização de Suportes

A imobilização enzimática é uma estratégia amplamente aplicada para aprimorar a estabilidade operacional, a reutilização e o controle de reações enzimáticas em processos biotecnológicos e industriais (MAGHRABY et al., 2023). Diversas técnicas foram desenvolvidas, cada uma baseada em interações físico-químicas distintas entre a enzima, o material de suporte e, em alguns casos, agentes de reticulação ou ativação específicos (BIÉ et al., 2022). A Figura 10 aponta os principais tipos de imobilização enzimática, desde métodos químicos, como ligação covalente, adsorção, reticulação e ligação por afinidade, até métodos físicos, como encapsulamento e aprisionamento.

Figura 10 – Representação esquemática das principais estratégias de imobilização enzimática.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como mostra a Figura 10, a adsorção envolve interações físicas fracas entre a enzima e a superfície de suporte. A ligação covalente garante uma forte ligação por meio de ligações químicas formadas com grupos funcionais no suporte. A reticulação gera agregados enzimáticos estáveis, formando ligações covalentes intermoleculares, frequentemente sem um suporte sólido. A ligação por afinidade utiliza interações específicas para imobilização orientada e

seletiva. O aprisionamento confina as enzimas dentro de um gel poroso ou rede polimérica, enquanto o encapsulamento envolve o encapsulamento das enzimas dentro de membranas semipermeáveis ou microesferas, permitindo a difusão do substrato e do produto, mantendo o biocatalisador.

A adsorção física é uma das formas mais simples de imobilização enzimática. Nessa abordagem, as enzimas aderem à superfície de um material de suporte por meio de forças fracas e não covalentes, como interações de van der Waals, ligações de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos ou atrações eletrostáticas (GUISAN et al., 2022). Os suportes comumente utilizados incluem materiais porosos, como carvão ativado, sílica ou esferas de polímero. Essa técnica preserva a estrutura da enzima devido à ausência de modificação química e geralmente mantém alta atividade catalítica. No entanto, sua principal limitação é a fraca força de ligação, que frequentemente leva à lixiviação da enzima durante o uso, especialmente quando o pH, a temperatura ou a força iônica variam (YAO et al., 2022).

A ligação covalente envolve a formação de ligações covalentes estáveis entre grupos funcionais presentes na superfície da enzima, tipicamente grupos amino, carboxila, tiol ou hidroxila, e grupos ativados no suporte (LIU et al., 2021). Este método requer ativação química do material de suporte, frequentemente utilizando agentes como GLU, carbodiimidas como EDC/NHS, epícloridrina ou outros reagentes bifuncionais. Os suportes utilizados para ligação covalente incluem resinas ativadas por epóxi, sílica funcionalizada, agarose e biocarvões modificados (CAVALCANTE et al., 2021). Embora a imobilização covalente proporcione uma ligação forte e durável com alta resistência à dessorção, ela pode induzir desnaturação parcial ou restringir a flexibilidade conformacional da enzima, potencialmente reduzindo sua eficiência catalítica se o sítio ativo estiver envolvido no processo de ligação (ZHU et al., 2023).

A reticulação, frequentemente referida como imobilização sem suporte, envolve a formação de ligações covalentes intermoleculares diretamente entre moléculas de enzimas. Isso resulta na formação de agregados estáveis e insolúveis, como agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) ou cristais enzimáticos reticulados (CLECs) (FENG et al., 2022). O GLU é o agente de reticulação mais comumente utilizado, reagindo com resíduos de lisina para formar bases de Schiff ou aminas secundárias. A reticulação também pode ser combinada com outros métodos, como adsorção ou aprisionamento, para melhorar a integridade estrutural (FENG et al., 2023). Embora essa abordagem possa aumentar a estabilidade térmica e

operacional, ela também pode introduzir limitações difusionais ou impedimento estérico, dependendo do tamanho e da compactação do agregado (ZAHIRINEJAD et al., 2021).

A ligação por afinidade é um método altamente seletivo baseado em interações moleculares específicas entre a enzima e um ligante ancorado ao suporte. Sistemas comuns incluem o uso de afinidade por íons metálicos, como suportes quelados com níquel ou cobalto para enzimas marcadas com His, ou interações biológicas como pares antígeno-anticorpo ou lectina-açúcar (FEDERSEL et al., 2021). Este método proporciona imobilização orientada e controlada, preservando a acessibilidade ao sítio ativo e, frequentemente, melhorando o desempenho catalítico. No entanto, pode envolver uma preparação complexa e dispendiosa do suporte funcionalizado, o que pode limitar sua escalabilidade (XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022).

Aprisionamento refere-se ao confinamento físico de enzimas dentro da estrutura de um gel ou matriz polimérica, sem interações covalentes com o suporte (IMAM; MARR; MARR, 2021). Materiais como alginato, poliacrilamida, carragenina ou sílica derivada de sol-gel são comumente empregados (PÉREZ-TOMÁS et al., 2024). O aprisionamento permite que a enzima permaneça em um ambiente hidratado semelhante ao seu estado nativo, frequentemente preservando sua atividade e protegendo-a de agentes desnaturantes externos (SHEN et al., 2022). No entanto, a resistência à transferência de massa e a possibilidade de vazamento da enzima são os principais desafios desse método (RIBEIRO et al., 2021).

O encapsulamento, embora conceitualmente semelhante ao aprisionamento, envolve o encapsulamento de enzimas em compartimentos definidos, como microesferas, nanocápsulas, lipossomas ou membranas semipermeáveis (WANG; LIAO, 2021). Esses compartimentos são projetados para permitir a difusão de substratos e produtos, retraindo a enzima. O encapsulamento proporciona excelente proteção contra o estresse ambiental e permite um controle preciso do microambiente que circunda a enzima (ZHANG et al., 2022). No entanto, semelhante ao aprisionamento, as limitações difusionais podem afetar as taxas de reação, e o próprio processo de encapsulamento pode ser tecnicamente complexo (WENG et al., 2023a).

A Tabela 3 apresentada resume exemplos representativos de enzimas imobilizadas utilizadas em diversas aplicações biotecnológicas e industriais. Esses biocatalisadores incluem lipases, oxidases, peroxidases e hidrolases, frequentemente empregadas em processos como esterificação, oxidação, degradação de poluentes e biossensores. A escolha do material de suporte e do método de imobilização influencia significativamente o desempenho, a

estabilidade e a reutilização da enzima. Em muitos casos, a imobilização covalente requer o uso de agentes ativadores, como GLU, epicloridrina ou carbodiimidas, para facilitar a formação de ligações estáveis entre a enzima e a superfície funcionalizada do suporte.

Da mesma forma, interações de afinidade e estratégias de reticulação frequentemente envolvem modificadores químicos para aumentar a força de ligação e o controle da orientação. Os exemplos fornecidos ilustram como abordagens de imobilização personalizadas podem ser utilizadas para melhorar a eficiência catalítica em condições operacionais.

A imobilização de enzimas tem um impacto significativo em sua estabilidade e reutilização, dois fatores críticos para sua aplicação prática em processos industriais (MIN; YOO, 2014). Ao ancorar enzimas em suportes sólidos ou dentro de matrizes definidas, sua integridade estrutural é frequentemente aprimorada, tornando-as mais resistentes à desnaturação térmica, variações de pH e à presença de solventes orgânicos. Além disso, a imobilização reduz a probabilidade de agregação ou autólise enzimática, o que contribui para o prolongamento da atividade catalítica ao longo do tempo.

Além da estabilidade aprimorada, as enzimas imobilizadas podem ser facilmente separadas do meio de reação, permitindo múltiplos ciclos de uso sem perda substancial de atividade (GARCIA-GALAN et al., 2011). Essa reutilização não apenas reduz os custos operacionais, mas também se alinha aos princípios da química verde, minimizando a geração de resíduos e o consumo de recursos. A extensão desses benefícios, no entanto, depende do método de imobilização, do material de suporte e da interação entre a enzima e o suporte, todos os quais devem ser cuidadosamente otimizados para atingir o desempenho máximo (NGUYEN; KIM, 2017).

Tabela 3 – Exemplos de enzimas imobilizadas, incluindo o tipo de material de suporte, método de imobilização, agentes de reticulação ou ativação (quando aplicável) e referências bibliográficas representativas. As estratégias listadas ilustram a diversidade de interações enzima-suporte e modificações químicas utilizadas para aumentar a estabilidade e a reutilização enzimáticas em diversas aplicações biotecnológicas (continua).

Enzima	Material suporte	Tipo de imobilização	Agente de ativação	Aplicação	Referências
Lipase (<i>Candida antarctica</i>)	Nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄ -sílica)	Ligação covalente	Glutaraldeído	Esterificação e transesterificação na produção de biodiesel	(JI et al., 2021) (LU et al., 2023) (LU et al., 2021) (AGHABEIGI et al., 2023)
Lacase	<i>Beads</i> de quitosana	Ligação covalente	Carbodiimida (EDC/NHS)	Degradação de compostos fenólicos e remoção de corantes	(DENG et al., 2022) (CHEN et al., 2022) (RUXANDRA LEONTIEȘ et al., 2022)
β-Galactosidase	Alginato	Aprisionamento / Encapsulamento	–	Hidrólise de lactose no processamento de laticínios	(HACKENHAAR et al., 2022) (HASSAN; IBRAHIM; ABDELLA, 2024) (ABDELLA; HASSAN; SOLIMAN, 2025) (ABDELLA; HASSAN, 2024)
Glucose oxidase (GOx)	Óxido de grafeno	Adsorção física	–	Biossensores para monitoramento de glicose	(KHATAMI et al., 2022) (YANG et al., 2023a) (ZHANG et al., 2025a)
Peroxidase de raiz-forte (HRP)	Sílica mesoporosa (SBA-15)	Ligação covalente	Glutaraldeído	Remoção de poluentes orgânicos e tratamento de águas residuais	(AL-MAQDI et al., 2021) (MOORTHY; NAGAPPAN; HA, 2022) (HSU et al., 2025) (MA et al., 2021)

Lipase (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Resina acrílica ativada por epóxi (Eupergit C)	Ligação covalente	Grupos epóxi (intrínsecos)	Síntese de ésteres e lipídios estruturados	(VASILESCU et al., 2022) (NI et al., 2025) (MOYA JOËLLE CAROLE et al., 2023)
Celulase	Hidrogel de poliacrilamida	Aprisionamento	–	Hidrólise de celulose para produção de bioetanol	(MOTAMEDI et al., 2021) (KARIM et al., 2021) (JOHN; SELVARAJAN, 2024)
Urease	Silica gel	Adsorção física	–	Deteção de ureia e biossensores	(HARANAL; RANGANATH; MAITY, 2025) (HUSSAIN et al., 2022) (WANG et al., 2021) (MANDAL et al., 2022)
Lacase	Biocarvão funcionalizado com DTPMP	Ligação covalente	DTPMP + glutaraldeído	Biorremediação e degradação de corantes	(YU et al., 2025) (XIE et al., 2023) (LONAPPAN et al., 2018a) (LONAPPAN et al., 2018b)
Lipase (<i>Pseudomonas fluorescens</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Beads de Agarose	Ligação covalente	Epicloridrina	Modificação de gorduras e óleos na indústria alimentícia	(LOKHA et al., 2020) (ARANA-PEÑA et al., 2020) (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2018)

Fonte: Elaborado pelo autor.

2.6 Aplicações Industriais

2.6.1 Indústria alimentícia

As enzimas são utilizadas há muito tempo no processamento de alimentos (queijo, pão, suco, cerveja, vinho). A imobilização está ganhando força em alimentos líquidos para permitir o processamento contínuo e a reutilização (CHALELLA MAZZOCATO; JACQUIER, 2024). Por exemplo, a β -galactosidase (lactase) imobilizada é amplamente aplicada na produção de laticínios sem lactose. Reatores de fluxo contínuo preenchidos com lactase em suportes (por exemplo, agarose ativada ou partículas magnéticas) hidrolisam a lactose do leite, mantendo a atividade enzimática. Em estudos recentes, a β -galactosidase imobilizada em quitosana catalisou a hidrólise da lactose em múltiplos lotes de leite, mantendo alta atividade por pelo menos 10 ciclos consecutivos. Isso permite o processamento econômico de alimentos infantis sem lactose. Outro exemplo é o coalho imobilizado (quimosina) para a produção de queijo. Quando fixada em NPs de alginato-quitosana, a enzima coagulante pode ser recuperada após cada lote, ao contrário da quimosina livre, que permanece no queijo final (ALZAHIRANI et al., 2024).

Pectinases imobilizadas são utilizadas na clarificação de sucos de frutas; por exemplo, a pectinase de *Aspergillus*, covalentemente ligada a grânulos de alginato-montmorilonita ativados por GLU, permaneceu > 79% ativa em condições ácidas (pH 4–5) e clarificou sucos de abacaxi e maçã com eficácia (CHALELLA MAZZOCATO; JACQUIER, 2024). Proteases imobilizadas (p. ex., papaína) e poligalacturonases são utilizadas para reduzir a turbidez e o amargor em sucos ou leites vegetais (AMIN et al., 2023). Na produção de cerveja e vinho, glicosidases e pectinases imobilizadas demonstraram aprimorar a extração de aroma e o controle da turbidez. Por exemplo, coquetéis de β -glicosidases imobilizadas demonstraram aumentar significativamente os terpenos aromáticos livres no vinho durante semanas de operação (CHALELLA MAZZOCATO; JACQUIER, 2024; MONTEIRO et al., 2019a).

Novos suportes e métodos de fabricação estão em desenvolvimento ativo. Resíduos agroindustriais (cascas de frutas, fibras vegetais) e NMs bioderivados estão sendo testados como suportes de baixo custo e de qualidade alimentar. Hidrogéis e criogéis projetados oferecem alta porosidade e resistência mecânica (por exemplo, criogéis de quitosana/poliacrilamida reticulados com GLU produziram reatores gelatinosos reutilizáveis).

Métodos de ponta, como impressão 3D e eletropulverização coaxial, permitem o encapsulamento preciso de enzimas em arquiteturas de microrreatores (XIE; ZHANG; SIMPSON, 2022). Por exemplo, biotintas à base de quitosana e proteína de soro de leite destacam-se como materiais promissores para impressão de alimentos em 3D/4D, combinando biodegradabilidade, biocompatibilidade e funcionalidade. A quitosana fornece propriedades antimicrobianas e estruturais, enquanto o soro de leite melhora a textura, o valor nutricional e a printabilidade. Sua combinação forma géis complexos que superam limitações individuais (por exemplo, baixa estabilidade da quitosana e fragilidade do soro de leite), possibilitando aplicações como embalagens inovadoras (com sensores de pH ou liberação controlada), estruturas de carne cultivada, encapsulamento de probióticos e substitutos de gordura (via emulsões de Pickering). A sinergia entre os componentes também possibilita o desenvolvimento de impressão 4D, na qual os produtos respondem a estímulos (como pH ou temperatura) com mudanças de forma ou cor. Embora desafios como a otimização do pós-processamento e a aceitação pelo consumidor persistam, essas biotintas sustentáveis abrem caminho para alimentos personalizados, funcionalmente aprimorados e ecologicamente corretos (YANG et al., 2022).

2.6.2 Indústria farmacêutica

Na indústria farmacêutica, enzimas imobilizadas são utilizadas para sintetizar intermediários quirais de fármacos e IFAs de alto valor com maior eficiência. Um exemplo clássico é a penicilina acilase (penicilina amidase), imobilizada em suportes sólidos para produzir ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), o núcleo β -lactâmico das penicilinas semissintéticas (GESTRELIUS, 1980). Outros antibióticos (cefalosporinas) também utilizam acilases imobilizadas. Mais recentemente, a biocatálise industrial para IFAs (por exemplo, álcoois quirais, aminas, nucleosídeos) frequentemente utiliza enzimas como transaminases, desidrogenases e cetoreduases, tanto na forma imobilizada quanto como células inteiras. Cascatas enzimáticas (múltiplas enzimas em sequência) estão sendo implementadas em reatores de fluxo para substituir sínteses químicas em múltiplas etapas (SIMIĆ et al., 2022). Por exemplo, enzimas desidrogenase de álcool co-imobilizadas e enzimas de reciclagem de cofatores em esferas porosas podem produzir continuamente álcoois quirais em escalas de vários quilogramas. Exemplos farmacêuticos também incluem lipases imobilizadas para reações de acilação e desacilação, bem como glicosiltransferases imobilizadas na produção de fármacos à

base de nucleotídeos e açúcares. Esses casos ressaltam que os sistemas imobilizados devem atender aos padrões de Boas Práticas de Fabricação (BPF) (por exemplo, sem lixiviantes tóxicos) e frequentemente toleram solventes orgânicos (SIMIĆ et al., 2022; ZHOU et al., 2021a).

Os avanços incluem suportes personalizados e formatos de microrreatores. MOFs e nanofibras poliméricas estão sendo exploradas como estruturas ultraporosas e quimicamente ajustáveis que podem aumentar a estabilidade enzimática sem o uso de produtos químicos agressivos (CHALELLA MAZZOCATO; JACQUIER, 2024; LV et al., 2021). Técnicas de ligação covalente direcionada (por exemplo, imobilização sítio-específica) maximizam a acessibilidade ao sítio ativo. Reatores microfluídicos e monolíticos incorporam enzimas imobilizadas em microcanais ou monólitos porosos para triagem de alto rendimento e rápida ampliação de escala (NAGY; SZABO; GASPARG, 2022). A coimobilização multienzimática também está avançando: por exemplo, "nanorreatores" de cascata enzimática encapsulam catalisadores sucessivos em camadas concêntricas, imitando a compartimentalização celular, para conduzir sínteses farmacêuticas sequenciais em um único recipiente. Essas tecnologias visam atender às demandas farmacêuticas por alto rendimento, estereosseletividade e processamento contínuo (BILAL et al., 2021).

2.6.3 Produção de biodiesel

A produção enzimática de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos graxos) utiliza lipases imobilizadas para catalisar a transesterificação de gorduras ou óleos com metanol ou etanol. Os sistemas de lipases imobilizadas permitem o uso de matérias-primas de baixa qualidade (por exemplo, óleo de cozinha usado (LIMA NETO et al., 2025), óleo de babaçu residual (MOREIRA et al., 2020b) e óleo de babaçu virgem (ALEXANDRE et al., 2022), óleo de microalgas (FERREIRA MOTA et al., 2022), gordura de frango (ROCHA et al., 2021) ou mesmo óleos locais de diversas regiões (BRANDÃO JÚNIOR et al., 2023) e geram menos subprodutos em comparação com a catálise química (LV et al., 2021).

Eversa® e Eversa® Transform 2.0 da Novozymes são lipases líquidas geneticamente modificadas adaptadas para produção de biodiesel que foram imobilizadas em suportes para reutilização (LV et al., 2021; SANTOS et al., 2024). Estudos confirmam a eficácia dessas enzimas. Remonatto et al. (2018) demonstraram que Eversa® Transform e Eversa® Transform 2.0, quando usadas em suportes hidrofóbicos (especialmente Sepabeads-C18) via adsorção

interfacial, alcançaram rendimentos acima de 95%, com atividade catalítica excepcional na produção de ésteres etílicos (FAEE) e metílicos (FAME) de ácidos graxos a partir de óleo de girassol em hexano anidro. O biocatalisador Sepabeads-Eversa® Transform 2.0 se destacou, atingindo 99% de conversão para FAEE em 3 horas (40 °C, razão molar etanol/óleo de 4:1), com seletividade completa de ésteres e ausência de diacilgliceróis. A lipase imobilizada manteve 75% de sua atividade após quatro ciclos de reutilização na síntese de FAEE, demonstrando robustez operacional. Em contraste, o metanol aumentou a atividade catalítica (99% de FAME em condições otimizadas), mas reduziu a estabilidade da enzima (perda > 50% após 7 horas). A funcionalização pós-imobilização com polímeros hidrofílicos (PEI/PAA) dobrou a taxa de formação de ésteres, embora sem ganhos de estabilidade (REMONATTO et al., 2018).

As principais tendências abordam o custo e a estabilidade da lipase. Suportes avançados (nanotubos de carbono, zeólitas, nanofibras) oferecem carga e estabilidade muito elevadas. Formatos sem suporte (por exemplo, agregados enzimáticos reticulados, CLEAs) concentram enzimas e eliminam os custos com suportes. A engenharia de proteínas produziu variantes de lipase com tolerância muito maior ao metanol e à temperatura, permitindo processos contínuos de maior rendimento. Na engenharia de reatores, projetos intensificados (por exemplo, leitos fixos recirculantes, sistemas assistidos por ultrassom) elevam a conversão acima de 99%. Biorreatores imobilizados também estão sendo acoplados à remoção de glicerol em linha (por exemplo, por meio de membranas) para conduzir as reações até a conclusão (LV et al., 2021).

2.6.4 Biorremediação

Enzimas imobilizadas são cada vez mais utilizadas para desintoxicar poluentes (corantes, fenóis, pesticidas, produtos farmacêuticos) em águas residuais. Os casos mais estudados envolvem oxidases degradadoras de lignina. Por exemplo, lacase fúngica imobilizada em suportes tem sido aplicada a efluentes de corantes têxteis. Um estudo recente imobilizou lacase de *Pycnoporus* em filtros de NPs de sílica/poliéster, alcançando ~39% de remoção de corante no tratamento de fluxo contínuo do corante Vermelho Congo, o que superou significativamente a taxa de remoção da enzima livre (remoção de 8%) (LOPEZ-BARBOSA et al., 2020). Outro exemplo utilizou uma lacase geneticamente modificada de *Cyathus bulleri* em um biorreator de membrana: a operação contínua (tempo de retenção de 6 horas) resultou em ~95% de

descoloração do efluente têxtil real e 96% de redução da toxicidade, demonstrando viabilidade em escala piloto (DAHIYA et al., 2023). Peroxidasas imobilizadas (p. ex., peroxidase de raiz-forte) e azoredutases também foram testadas para poluentes fenólicos e nitroaromáticos. Em alguns casos, biosuportes revestidos com enzimas (p. ex., esferas de alginato com enzimas imobilizadas) foram utilizados em colunas de tratamento ou reatores em batelada. Esses exemplos demonstram que a imobilização permite alta carga de catalisador e reutilização em fluxos contaminados (JONOVIC et al., 2022; URREA et al., 2021; WEBER et al., 2023).

As áreas de foco incluem materiais nanométricos e híbridos. Os suportes nanoporosos (por exemplo, sílica mesoporosa, MOFs) podem encapsular enzimas, protegendo-as de desnaturantes. A combinação de enzimas com mediadores redox (sistemas lacase-mediador imobilizados) expande a gama de substratos. A engenharia de proteínas produziu lacases e peroxidasas com alta tolerância a sais, solventes e pH extremo, tornando-as mais práticas para efluentes reais. Além disso, projetos de biorreatores integrados estão promovendo o avanço dos reatores de membrana enzimática, e leitos fluidizados permitem a remoção contínua de poluentes. Por exemplo, um reator enzima-membrana de modo contínuo manteve alta descoloração (> 95%) por mais de 80 horas com incrustação mínima da membrana (DAHIYA et al., 2023).

2.7 Desafios e Perspectivas Futuras

Embora avanços recentes no contexto da imobilização enzimática tenham contribuído significativamente para a expansão de sua aplicabilidade, desafios ainda persistem e são fatores limitantes para seu uso em escala industrial (PATTI et al., 2025; T.SRIWONG; MATSUDA, 2022; XU et al., 2023b). Assim, à medida que a engenharia de materiais e as tecnologias computacionais progredem, novas possibilidades surgem (BARATI et al., 2024), especialmente quando alinhadas a vieses de sustentabilidade e regulatórios (ATIROĞLU et al., 2024; BADGUJAR; BADGUJAR; BHANAGE, 2022; CAVALCANTE et al., 2024; NAWAZ et al., 2021).

Nos últimos anos, a comunidade científica tem se esforçado cada vez mais para incorporar ferramentas de inteligência artificial aos processos de previsão, otimização e seleção dos materiais de suporte utilizados na imobilização enzimática (SINGH et al., 2021; ŚWIDEREK et al., 2025; TADESSE; LIU, 2025; WEI; SMITH, 2023). Isso possibilitou a

previsão de interações entre enzimas e superfícies sólidas por meio de modelos computacionais baseados em aprendizado de máquina, aprimorando desde a seleção de suportes até a determinação das melhores condições de imobilização (CHAI et al., 2021; LIANG et al., 2024; MOU et al., 2021; RALBOVSKY; SMITH, 2021; SÁNCHEZ-MORÁN et al., 2023).

Paralelamente a isso, a engenharia de materiais acompanhou esse movimento, desenvolvendo suportes altamente porosos e funcionalizados com geometria controlada. Estruturas como MOFs (*Metal-Organic Frameworks*), COFs (*Covalent Organic Frameworks*) e nanocompósitos híbridos são exemplos notáveis dessa nova geração de materiais, que combinam alta estabilidade térmica, grande área superficial e a possibilidade de modificação química personalizada (FENG et al., 2023, 2022; SHER et al., 2019; TU et al., 2021; WANG; LAN; MA, 2020). A tendência é que novos materiais capazes de responder a estímulos externos, como pH, temperatura ou campo magnético, e modular a atividade enzimática conforme necessário, sejam desenvolvidos no futuro (CARRARO et al., 2024; HAN et al., 2018; ZHOU et al., 2021b).

Outro aspecto que vem ganhando destaque na literatura científica é a necessidade de alinhar a imobilização enzimática aos princípios da sustentabilidade. Com a crescente demanda por processos industriais mais verdes e o surgimento de legislações ambientais mais rigorosas, torna-se imperativo substituir suportes derivados de fontes não renováveis por biomateriais mais ecologicamente viáveis (KOTWAL et al., 2024; XU et al., 2023a; ZANUSO et al., 2021). Nesse contexto, resíduos lignocelulósicos, lignina, quitosana, celulose bacteriana e outros polímeros naturais estão sendo investigados como alternativas promissoras (CALIFANO et al., 2024; MUKHEJA et al., 2024; PIROZZI; LATTE; SANNINO, 2023). Esses materiais não só apresentam baixo custo e ampla disponibilidade, como também oferecem vantagens estruturais, como alta funcionalidade de superfície e boa biocompatibilidade, o que os torna particularmente adequados para imobilização enzimática. A lignina, em particular, tem apresentado excelentes resultados em termos de estabilidade, reutilização e resistência a solventes orgânicos, características desejáveis para aplicações contínuas (BENÍTEZ-MATEOS et al., 2021; KLAPISZEWSKI; ZDARTA; JESIONOWSKI, 2018; STANISZ et al., 2022).

É importante ressaltar que, embora o uso de biomateriais represente um avanço significativo, sua adoção em escala industrial ainda depende da superação de desafios técnicos, como a padronização das propriedades físicas e químicas dos suportes e a garantia da estabilidade ao longo do tempo (KHAN, 2021). Mesmo assim, a convergência entre inovação

tecnológica e sustentabilidade representa um dos caminhos mais promissores para o futuro da imobilização enzimática.

Por fim, um aspecto que não pode ser negligenciado são os requisitos regulatórios e as demandas do setor industrial. Para que biocatalisadores imobilizados sejam amplamente utilizados em setores como o farmacêutico, alimentício e ambiental, eles devem atender a rigorosos critérios de segurança, pureza e desempenho (BOLIVAR; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2022). Nesse sentido, os suportes utilizados devem ser isentos de contaminantes tóxicos e compatíveis com os padrões estabelecidos por órgãos reguladores como ANVISA, FDA ou EMA. Além disso, é essencial que os processos de imobilização sejam reprodutíveis, escaláveis e economicamente viáveis, garantindo que o desempenho observado em laboratório possa ser mantido em ambientes industriais.

A estabilidade ao longo de múltiplos ciclos de uso, bem como a facilidade de regeneração e descarte de suportes, também são aspectos essenciais. Modelos como agregados enzimáticos reticulados (CLEAs) e suas variantes têm se mostrado promissores nesse contexto, mas ainda enfrentam barreiras relacionadas ao custo de produção e à necessidade de enzimas de alta pureza (SHELDON, 2011; YAMAGUCHI; KIYOTA; MIYAZAKI, 2018). Ainda mais desafiador é garantir a uniformidade entre lotes e a previsibilidade do desempenho catalítico em diferentes contextos operacionais. Para tanto, investimentos têm sido feitos na padronização de metodologias, no controle rigoroso das variáveis de síntese e no uso de ferramentas de monitoramento em tempo real. Assim, incorporar requisitos regulatórios desde os estágios iniciais do desenvolvimento do material de suporte é uma estratégia eficaz para permitir a aplicação industrial em larga escala.

Em resumo, os desafios impostos pela imobilização enzimática não são triviais, mas também não são intransponíveis. A integração da inteligência artificial com a engenharia de materiais abre novos horizontes para o desenvolvimento de suportes altamente eficientes e customizados. Ao mesmo tempo, a adoção de biomateriais sustentáveis permite aliar desempenho técnico à responsabilidade ambiental, promovendo uma biotecnologia mais alinhada aos princípios da economia circular.

Além disso, ao considerar os requisitos regulatórios e industriais desde o início do processo de pesquisa, torna-se possível acelerar a transição do laboratório para o mercado, garantindo soluções seguras, eficazes e escaláveis.

2.8 Conclusão

Esta pesquisa forneceu uma visão abrangente do cenário atual de pesquisa e das tendências globais emergentes sobre materiais suporte para imobilização de enzimas. Houve um aumento notável nos avanços tecnológicos, bem como um crescimento substancial na importância e viabilidade de diferentes tipos de materiais suporte para imobilização de enzimas. Este campo de pesquisa esteja em rápida expansão, com potencial para um aumento na publicação de novos estudos nos próximos anos. No entanto, para fortalecer e expandir a colaboração entre diferentes grupos de pesquisa, é essencial realizar sinergias e conexões mais concretas. Apesar do crescimento no número de publicações ao longo dos anos, desafios substanciais permanecem, mostrando oportunidades de desenvolvimentos de matérias suportes mais adequados para cada tipo de aplicação e com melhores desempenhos.

A análise bibliométrica evidencia que países emergentes, como o Brasil, começam a ganhar relevância ao lado de EUA e China, reforçando a internacionalização do tema. A bibliometria também revela que o campo da imobilização enzimática passa por uma transição de suportes clássicos para sistemas híbridos, multifuncionais e ecoeficientes. Embora os suportes tradicionais ainda sejam dominantes, o futuro aponta para materiais híbridos e multifuncionais, capazes de oferecer maior estabilidade e adaptabilidade. Observa-se também lacunas importantes como a necessidade de ampliar pesquisas com lipases comerciais acessíveis, de baixo custo e alta aplicabilidade industrial, como a Eversa® Transform 2.0, que ainda é pouco explorada em sistemas imobilizados. Apesar da popularidade das nanopartículas magnéticas, observa-se escassez de estudos com suportes heterofuncionais baseados em fosfonatos. Assim, os resultados bibliométricos deste estudo não apenas confirmam observações clássicas, mas também se alinham com as análises mais atuais, consolidando a relevância do tema.

Nesse sentido, este trabalho não apenas revisa o panorama da área ou descreve o estado da arte, mas também responde diretamente às lacunas identificadas, propondo e avaliando um novo suporte heterofuncional magnético ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$). Assim, a bibliometria não é apenas retrospectiva, mas prospectiva, posicionando o artigo dentro das tendências globais de biocatálise sustentável ao propor o desenvolvimento do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$. Assim, os resultados bibliométricos deste estudo não apenas confirmam observações clássicas, mas também se alinham com as análises mais atuais, consolidando a relevância do tema.

3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1 Materiais

A lipase comercial Eversa® Transform 2.0 (ET2 - *Aspergillus oryzae* - 41,57 mg/mL), *p*-nitrofenol (PNP), as soluções de glutaraldeído (GLU) grau II, butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) e Triton X-100 foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Cajamar, São Paulo, Brasil). O cloreto de ferro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), sulfato de ferro heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) e fosfato de sódio dibásico ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

O dietilenotriaminopenta (ácido metileno fosfônico) - (DTPMP) 50% (T) foi adquirido da Sigma-Aldrich (Cajamar, São Paulo, Brasil). O hidróxido de amônio (29%) (NH_4OH) foi adquirido da Dinâmica Química (Indaiatuba, São Paulo, Brasil). Todos os outros reagentes foram utilizados como recebidos, sem qualquer purificação adicional. Para a elaboração do planejamento experimental utilizando o método Taguchi, foram utilizados os softwares Statistica® 10 (Statsoft, EUA) e Minitab® (Minitab, LLC).

3.2 Síntese sonoquímica de NPs de Fe_3O_4 funcionalizadas com DTPMP

As NPs de Fe_3O_4 funcionalizadas com DTPMP foram sintetizadas de acordo com o método assistido por ultrassom proposto por Neto et al. (2021), com algumas modificações. Utilizando um equipamento de ultrassom (Q500 Sonicator - Qsonica) com um diâmetro de micropona de 3,2 mm, sob condições de sonicação de 300 W e regime de pulso de 3 segundos ligado e 1 segundo desligado. Foram pesadas 1,0 g (3,6 mmol) de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 1,9 g (7 mmol) de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, os quais foram dissolvidas em 15 mL de água deionizada. Esta solução foi sonicada, nas condições descritas, por 4 minutos. Posteriormente, foram adicionados 10 mL de solução concentrada de NH_4OH sob sonicação por mais 4 minutos. Em seguida, 4 mL de uma solução contendo 1 g (1,7 mmol) de DTPMP foram adicionados à mistura reacional, permitindo a sonicação por mais 4 minutos, concluindo o processo de síntese.

A fim de remover o excesso de NH_4OH e as moléculas de DTPMP não ligadas, as partículas obtidas foram separadas magneticamente e lavadas três vezes com 40 mL de água deionizada. Posteriormente, foram dialisadas utilizando filtro de membrana de celulose

regenerada, 1 kDa NMWCO Ultracel® (25 mm de diâmetro), até atingirem pH neutro e secas em um dessecador contendo sílica.

3.3 Ativação do Fe₃O₄@DTPMP com GLU

As NPs de Fe₃O₄@DTPMP foram ativadas com GLU no intuito de gerar ligação covalente entre o suporte e a enzima. Dessa forma, 10 mg de Fe₃O₄@DTPMP foram pesadas em um microtubo, tipo eppendorf e, posteriormente adicionado 500µL de uma solução contendo 2,5% de GLU em tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7). A solução permaneceu sob agitação constante por 2 h a 25 °C (MONSAN, 1978). Em seguida, as NPs foram separadas magneticamente e lavadas cinco vezes com solução tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7) para remover o excesso de GLU (MONTEIRO et al., 2019b, 2019c, 2020; MOREIRA et al., 2020a), sendo denominadas a partir de agora como Fe₃O₄@DTPMP-GLU.

3.4 Imobilização da ET2 em Fe₃O₄@DTPMP-GLU e determinação da concentração proteica

Uma baixa força iônica (5 mM) foi escolhida para favorecer as interações eletrostáticas iniciais entre o suporte e a enzima (SOUSA et al., 2024). Para imobilização da ET2 (41,57 mg/mL) no suporte funcionalizado (Fe₃O₄@DTPMP-GLU), 10 mg de Fe₃O₄@DTPMP-GLU foram pesadas em um microtubo (tipo eppendorf) e adicionado 1mL de solução tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7) contendo ET2 (carga enzimática: 5mg/g de suporte), na presença de 0,01% de Triton X-100. Em seguida, o sistema foi submetido a agitação branda constante por 6h a 40 °C. Após esse período, a ET2 imobilizada e seu sobrenadante foram submetidos a leituras de atividade enzimática para obtenção de parâmetros de imobilização.

O teor de proteína foi determinado utilizando-se o método descrito por Bradford e a albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976). Ao final, a ET2 imobilizada foi separada magneticamente e lavada cinco vezes com tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7), visando retirar enzimas não imobilizadas (MONTEIRO et al., 2019b, 2019c, 2020; MOREIRA et al., 2020a), e armazenada a 4 °C.

3.5 Determinação da atividade enzimática

A determinação das atividades enzimáticas da ET2 livre e imobilizada foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Rios et al. (2016) com algumas modificações. O aumento da absorbância em 348nm (ponto isobéptico do *p*-nitrofenol) produzido pela hidrólise do *p*-NPB em *p*-NP, foi monitorado por 90 segundos de forma contínua para a enzima livre, sendo realizadas leituras pontuais nos tempos de 1, 3 e 5 minutos para a ET2 imobilizada.

Os ensaios foram realizados à 25 °C em solução tampão de fosfato de sódio (25mM e pH 7) utilizando um espectrofotômetro modelo Cary 60 UV-Vis adquirido da Agilent. A absorvidade molar (ϵ) obtida através da curva de calibração de *p*-NP no equipamento utilizado foi de 5,11 mM⁻¹cm⁻¹ (SOUZA et al., 2016).

A metodologia para a enzima livre consistiu em: 50µL da amostra e 50µL de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) adicionados a 2,5mL da solução tampão, já para a ET2 imobilizada, 10mg da mesma e 50µL de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) adicionados a 25mL da solução tampão e colocados sob agitação mecânica.

Nessas condições, a atividade da enzima livre foi expressa em U/mL podendo ser convertida para U/mg pela divisão por sua concentração (41,57 mg/mL) determinada pelo método de Bradford, já a atividade da ET2 imobilizada foi expressa em U/mg, onde a unidade internacional de atividade (U), foi definida como a atividade da enzima que produz 1µmol de *p*-NP por minuto (MONTEIRO et al., 2019b, 2019c; MOREIRA et al., 2020a). As análises foram realizadas em triplicata com uma margem de erro < 5%.

3.6 Parâmetros de imobilização

Para os cálculos dos parâmetros de imobilização da ET2 no suporte foram utilizadas as metodologias descritas em de Souza et al. (2020) e Cavalcante et al. (2022). Os parâmetros estudados foram compostos por rendimento de imobilização (R.I), atividade teórica (At.T), atividade do derivado (At.D) e atividade recuperada (At.R). Onde R.I é a porcentagem de atividade enzimática retida após imobilização, e calculada pela diferença entre a atividade inicial e final da enzima. At.T é a atividade esperada da ET2 imobilizada tomando como base a quantidade de enzima oferecida para o suporte e seu R.I (ARANA-PEÑA et al., 2021; SANTOS et al., 2017). At.D é a atividade da ET2 imobilizada sob determinadas condições de leitura e

At.R compara a atividade da ET2 imobilizada com a At.T (BRAHAM et al., 2021; MONTEIRO et al., 2019b, 2019c; MOREIRA et al., 2020a).

A seguir são dadas as equações utilizadas para calcular cada um dos parâmetros de imobilização.

$$R. I = \left(\frac{At_i - At_f}{At_i} \right) 100\% \quad (1)$$

$$At. T = At_{enz} (R. I) \quad (2)$$

$$At. D = \left(\frac{\Delta A}{\Delta t} \right) f \quad (3)$$

$$At. R = \left(\frac{At. D}{At. T} \right) 100\% \quad (4)$$

R.I e At.R são expressos em porcentagem, enquanto At.D e At.T em U/mg. At_i representa a atividade inicial e At_f a final. At_{enz} é a atividade da quantidade de enzima oferecida ao suporte. ΔA representa a variação da absorbância mensurada pelo espectrofotômetro em um intervalo de tempo (Δt) e f é um fator que está associado as condições de leitura da atividade enzimática (MELO et al., 2024).

3.7 Método Taguchi

Com o intuito de otimizar as condições experimentais de imobilização da enzima ET2 no suporte $Fe_3O_4@DTPMP-GLU$, o planejamento experimental Taguchi foi adotado. Para tal, uma matriz ortogonal padrão L9 (quadrado latino com 9 experimentos) foi utilizada para analisar quatro variáveis independentes em três níveis, visando definir o melhor ambiente reacional dentre a combinação dos níveis escolhidos, obtendo assim um processo de imobilização enzimática eficiente. Os fatores selecionados para otimizar a imobilização de ET2 no suporte $Fe_3O_4@DTPMP-GLU$ foram os mesmos relatados anteriormente por Melo et al. (2024), apenas uma temperatura foi modificada.

O autor estudou a imobilização de ET2 em MNPs híbridos. Para cada nível do método Taguchi, o mesmo procedimento descrito por Melo et al. (2024) foi realizado. As quatro variáveis independentes foram tempo (h), força iônica (mM), carga enzimática (mg/g) e temperatura (°C) (MELO et al., 2024), onde podemos observar seus níveis correspondentes na Tabela 4.

Tabela 4 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis.

	Tempo (h)	Força iônica (mM)	Carga enzimática (mg/g)	Temperatura (°C)
Nível 1	6	5	1	30
Nível 2	15	50	3	35
Nível 3	24	95	5	40

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tempo é um fator crítico no processo de imobilização. Tempos insuficientes geram baixa fixação da enzima no suporte, enquanto tempos maiores podem auxiliar no alcance do equilíbrio necessário para a formação de ligações covalentes mais estáveis. Como o suporte estudado é ativado com GLU, os níveis escolhidos podem favorecer a formação de ligações covalentes (FANG et al., 2011). A faixa de força iônica escolhida pode favorecer tanto as interações de troca iônica quanto as ligações covalentes, caso haja sítios de ligação disponíveis no suporte estudado (BARBOSA et al., 2014). Os níveis escolhidos para a massa de enzima ofertada (mg) por massa de suporte disponível (g) buscaram reduzir custos e o uso desnecessário de enzimas, o que pode levar a efeitos de aglomeração e bloqueio de sítios ativos no processo de imobilização (SUN; HU, 2017). Os valores de temperatura escolhidos foram baseados em informações fornecidas pela Sigma-Aldrich, que afirma que a lipase (ET2) opera a 40°C (SIGMA-ALDRICH, 2025). Os softwares Statistica® 10 e Minitab® foram utilizados para implementação do planejamento e posteriores análises estatísticas. Na Tabela 5 podemos observar o planejamento experimental Taguchi L9, onde existe a combinação entre as variáveis independentes e os níveis escolhidos, em que cada um deles participa de 3 experimentos.

Tabela 5 – Planejamento experimental Taguchi L9.

Experimento	Tempo (h)	Força iônica (mM)	Carga enzimática (mg/g)	Temperatura (°C)
1	6	5	1	30
2	6	50	3	35
3	6	95	5	40
4	15	5	3	40
5	15	50	5	30
6	15	95	1	35
7	24	5	5	35
8	24	50	1	40
9	24	95	3	30

Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir dos resultados obtidos de cada experimento do planejamento experimental, e utilizando a atividade da ET2 imobilizada como resposta, foram calculadas as relações S/R (sinal-ruído) com o auxílio do software Statistica® 10. Estas foram calculadas utilizando a função “maior é melhor”, uma vez que o objetivo do planejamento é maximizar a variável resposta (atividade da ET2 imobilizada). Para calcular as relações S/R foi utilizada a Equação (5) (MELO et al., 2024).

$$\frac{S}{R} = -10 \log \left(\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{1}{y_i^2} \right) \quad (5)$$

Onde as variáveis de resposta são simbolizadas por y, sendo que i representa o número de repetições e n o número de experimentos. Por meio da Equação (6), foi possível determinar a relação S/R esperada nas condições ideais de imobilização (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013; MELO et al., 2024).

$$\frac{S}{R_p} = \frac{\bar{S}}{R} + \sum_{j=1}^n \left(\frac{S}{R_j} - \frac{\bar{S}}{R} \right) \quad (6)$$

Em que S/R_p é o ponto ideal para cada fator, $\bar{S}/R$ é a média aritmética das variáveis estudadas, S/R_j é a razão no ponto ótimo para cada fator e n é o número de fatores que afetam significativamente o processo (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013; MELO et al., 2024).

3.8 Análise do processo de dessorção da ET2 imobilizada

Para avaliar a interação entre a enzima ET2 e o suporte Fe₃O₄@DTPMP-GLU, foram adicionados 500 µL de tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7), NaCl 1M ou 0,1% (v/v) de Triton X-100 a 50 mg da ET2 imobilizada e mantido sob agitação moderada. Após os tempos de 30 e 60 minutos, foram realizadas medidas de atividade da enzima livre (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013; RODRIGUES et al., 2019).

3.9 Estabilidade operacional em ciclos de reuso

Para checar a estabilidade operacional da ET2 imobilizada em ciclos de reuso, foram realizadas sucessivas leituras, onde 10mg da ET2 imobilizada e 50µL de p-NPB (50mM em

acetonitrila) foram adicionados a 25mL de solução tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7) e colocados sob agitação mecânica. O teste foi realizado até a obtenção de valores de atividade 50% abaixo da sua atividade inicial. Após a conclusão de cada ciclo a amostra foi lavada 3 vezes com água deionizada (XIE; HUANG, 2018).

3.10 Carga máxima de imobilização enzimática

A carga máxima de imobilização da enzima ET2 pelo suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ foi investigada através da adição de 10 mg do suporte em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7) contendo a enzima ET2 e 0,01% de Triton X-100.

As cargas enzimáticas utilizadas nos testes foram de 1, 3, 5, 7 e 10 mg de enzima por g de suporte, tais concentrações foram determinadas previamente segundo o método de Bradford e a albumina de soro bovino foi utilizada como padrão de análise (BRADFORD, 1976). Esse sistema foi posteriormente mantido sob agitação constante por 6 h a 40 °C, onde ao final do processo foi realizada a determinação de seus parâmetros de imobilização (SOUZA et al., 2016).

3.11 Estabilidade em solventes orgânicos

O teste de estabilidade em solventes orgânicos foi realizado tanto para a ET2 imobilizada quanto para a enzima livre. Os solventes estudados foram heptano, hexano, ciclo hexano, tetraidrofurano (THF) e acetonitrila. A atividade de ambos, em tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7) foi utilizada como padrão de comparação e definida como 100%. Para a ET2 imobilizada, 10mg foram adicionadas a 25mL de uma mistura contendo 25% de solvente orgânico em tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7).

Para a enzima livre, foi preparado 1mL de solução contendo a carga enzimática de imobilização da ET2 em tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7), onde 50 μL desta foi adicionada a 2,5mL da mistura contendo 25% de solvente orgânico em tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7). Os dois sistemas foram postos em agitação branda por 15 min, com posterior adição de 50 μL de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) e realizada a leitura de sua atividade enzimática.

3.12 Estabilidade em pH

Para avaliar o efeito do pH sobre a atividade enzimática da enzima livre e imobilizada, visando observar diferenças entre elas, diferentes tampões (acetato de sódio, fosfato de sódio e carbonato de sódio) nas concentrações de 5mM foram utilizados a fim de abranger a faixa que varia entre pH 4 e 10. Este processo foi realizado de acordo com Cherni et al. (2024), fazendo algumas modificações. Para a leitura da atividade da ET2 imobilizada, 10mg da mesma e 50 μ L de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) foram adicionados a 25mL de tampão, já para a enzima livre foi preparado 1mL de solução contendo a carga enzimática de imobilização da ET2 imobilizada em água deionizada, onde 50 μ L desta e 50 μ L de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) foram adicionadas a 2,5mL de tampão.

3.13 Estabilidade térmica

A atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foram avaliadas em diferentes temperaturas conforme a metodologia de Melo et al. (2017), com modificações. Para isso, foi preparado 1mL de solução de ET2, utilizando a mesma carga enzimática de imobilização da ET2 imobilizada, em tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7), com posterior incubação em banho termostático por 15 minutos. Em 10 mg de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$ foram adicionados a 1mL de tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7) e postos sob mesmas condições. As temperaturas estudadas foram de 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 °C.

Para testes realizados em temperaturas superiores a 30 °C, as amostras foram submetidas a resfriamento em banho de gelo por 1 minuto antes da leitura de suas atividades. As atividades foram medidas utilizando 50 μ L da solução de ET2 e 50 μ L de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) em 2,5mL de tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7), para a enzima livre, e uma massa de 10 mg juntamente com 50 μ L de *p*-NPB (50mM em acetonitrila) em 25mL de tampão fosfato de sódio (25mM e pH 7), para a ET2 imobilizada.

3.14 Estabilidade de armazenamento

A estabilidade do armazenamento da ET2 imobilizada no suporte foi avaliada pelo monitoramento da atividade hidrolítica utilizando *p*-NPB, sendo que 10 mg de ET2 imobilizada

foram adicionados a 50 μL de PBS (5 mM, pH 7) e armazenada sob refrigeração a 4 °C. A atividade foi monitorada por 60 dias e determinada periodicamente.

3.15 Caracterização dos Materiais

3.15.1 Difração de raios-X (XRD)

A análise XRD foi realizada em um difratômetro de pó X'Pert MPD (Panalytical), com uma faixa de varredura 2θ variando de 20° a 80°. Um tubo $\text{CuK}\alpha$ (1.54059 Å) foi utilizado para as amostras, operando a 40kV e 30mA, com faixa de varredura de 20° a 100°. Os padrões de difração foram obtidos usando a geometria Bragg-Brentano em modo contínuo com uma velocidade de 0,5° por minuto e um tamanho de passo de 0,02°(2 θ).

Para interpretação de resultados foram utilizados dois softwares, X'Pert HighScore Plus, para identificação de fase e obtenção de padrão cristalográfico, e Maud® para refinamento (método Rietveld) e análise de dados de difração. O tamanho de cristalito para cada amostra foi calculado utilizando a equação de Scherrer.

3.15.2 Magnetômetro de Amostra Vibrante (VSM)

O VSM foi realizado no Laboratório de Análise Magnética e Óptica (LAMOp) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN). Este aparelho possui vários módulos: gerador de funções (marca Perron, modelo MT 4070), um amplificador Lock-in (marca Signal Recovery, modelo 7265), um gaussímetro (marca LakeShore), um controlador de temperatura (marca LakeShore), uma fonte de tensão DC (marca Agilent technologies, modelo N8736A), um sistema de refrigeração a ciclo fechado de hélio um criostato (marca Cryogenics), uma bomba de vácuo turbo molecular (marca Pfeiffer vacuum), um eletroímã (marca LakeShore), um drive de 14 pol (marca Sellenium) e uma haste de fibra de carbono. O aparelho também possui compressor e bomba de vácuo que permite a diminuição da temperatura até 10 K com a queda de pressão no local onde fica a amostra. As curvas de magnetização obtidas pelo equipamento, foram a 300K. Para garantir a precisão dos momentos magnéticos foi realizada a calibração utilizando material de referência padrão. Para todas as medições o momento magnético obtido para cada campo aplicado foi normalizado pela massa da amostra.

3.15.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

As análises FTIR foram conduzidas em um espectrofotômetro Perkin Elmer 2000 equipado com um acessório de reflectância total atenuada (ATR) com cristal de seleneto de zinco (ZnSe). As amostras foram previamente secas para remoção da absorção de água e dispersas em brometo de potássio (KBr) na proporção de 1:10. Os pellets foram obtidos utilizando moldes com prensa hidráulica. As medições foram realizadas na resolução de 4cm^{-1} , média de 32 varreduras e cobrindo a faixa espectral de 4000 a 500 cm^{-1} .

3.15.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

As análises de TGA foram conduzidas em um analisador Mettler Toledo (TGA/SDTA851). O processo foi realizado sob atmosfera de nitrogênio (N_2), com fluxo contínuo de 50mL por minuto e aquecimento com taxa constante de 10°C por minuto, cobrindo uma faixa de 30°C a 800°C .

3.15.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (XRF)

Imagens de SEM e XRF foram realizadas para avaliar, respectivamente, a morfologia e a composição química dos materiais. A SEM foi realizada no microscópio QUANTA 450 FEG. As amostras foram fixadas em fita de carbono e metalizadas com prata usando o equipamento de metalização Quorum QT150ES. Um feixe de elétrons com 20 kV foi aplicado. A XRF foi realizada usando um equipamento SHIMADZU modelo EDX-7000 equipado com um tubo de ródio, aplicando uma potência de 4 kV às amostras de pó.

3.15.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução (HRTEM)

A microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) foi realizada em um HITACHI HT7700, operando a uma tensão de aceleração de 120 kV. Previamente, as amostras foram dispersas em água e uma gota foi colocada em uma grade de cobre revestida com carbono de 300 malhas e seca em condições ambientes.

3.15.7 Docking Molecular

A interação entre a enzima Eversa (PDB ID: 5XK2) e os componentes do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ se dá através da complexação com o DTPMP, com o intermediário químico GLU. Com base nisso, foi realizado o estudo de docking molecular após modelagem 3D destes componentes, e elucidação das bases moleculares responsável pela complexação da Lysina (resíduo da Eversa que é complexado no suporte) com o GLU, um intermediário na complexação com o DTPMP (MIRANDA et al., 2020). Em seguida, o complexo Lysine-Glutaraldeído (Lys-GLU) foi submetido ao docking molecular com o DTPMP, dando origem ao complexo DTPMP-GLU-Lys.

A estrutura dos ligantes foram obtidas do banco de dados PubChem: Lysine (ID: 5962), GLU (ID: 3485) e DTPMP (ID: 163192). As estruturas foram convertidas para a conformação 3D através do software OpenBabel (O'BOYLE et al., 2011) e tiveram suas energias minimizada para obtenção das conformações mais estáveis. Inicialmente, foram adicionados hidrogênios polares e cargas de Kollman foram aplicadas. Os arquivos foram convertidos no formato PDBQT e a caixa da busca, para realização dos cálculos de interação, foi definida com centros nas coordenadas do receptor, dimensões para cada eixos de 20 angstroms, com exaustividade = 64.

As duas etapas do docking molecular (Lys-GLU e DTPMP-Lys-GLU) foram realizadas com décima réplica independente, os clusters obtidos foram avaliados de acordo com sua energia estimada de ligação (kcal/mol) e as distancias entre as posições dos ligantes estimadas nos valores de RMSD (Root Mean Square Deviation). A análise dos complexos foi realizada usando o PyMol versão 1.4.7 (DELANO, 2015), que permitiu uma investigação detalhada dos complexos.

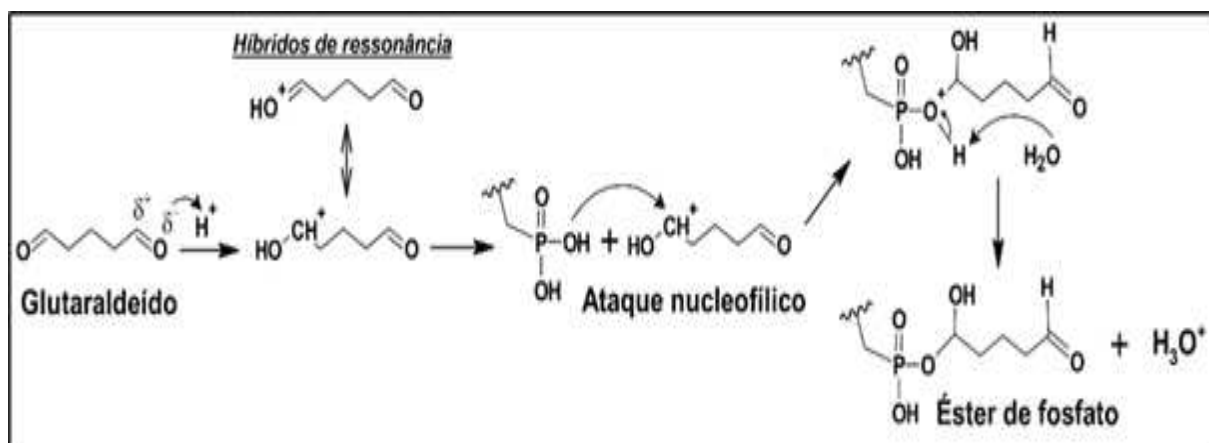
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ativação do $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ com GLU

A etapa de funcionalização do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ com GLU teve início com um levantamento bibliográfico, baseando-se em trabalhos que mostram o potencial ácido do DTPMP (LESUEUR; PFEFFER; FUERHACKER, 2005; TOMSON; KAN; ODDO, 1994) e a capacidade do GLU ligar-se a grupos fosfonatos (BOUZID; DJADI, 2021; FARRIS; SONG; HUANG, 2010; MOHAMMED et al., 2015; ROJAS, 2015). As condições reacionais concentração e tempo foram estabelecidas visando um processo menos oneroso, 2,5% e 2 h, respectivamente, já que existem relatos na literatura da não linearidade do aumento da atividade enzimática com o aumento destes parâmetros (MONSAN, 1978). O pH do tampão utilizado, pH 7, foi escolhido buscando um ambiente reacional que não contribuisse com a polimerização do GLU, processo conhecido como condensação aldólica, que é favorecido em condições alcalinas (KILDEEVA et al., 2009).

Como o DTPMP apresenta pKa igual a 1,038 (TOMSON; KAN; ODDO, 1994) e o pKa da solução tampão fosfato de sódio (5mM e pH 7), calculado através das equações de Henderson-Hasselbalch e Debye-Hückel, é aproximadamente 6,74, assim, o DTPMP é capaz de fornecer prótons ao meio reacional. Portanto, propomos que o mecanismo de ligação existente entre o GLU e o suporte ocorra de forma semelhante a formação de hemiacetais (Figura 11).

Figura 11 – Proposta de mecanismo de ligação entre $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ e GLU.

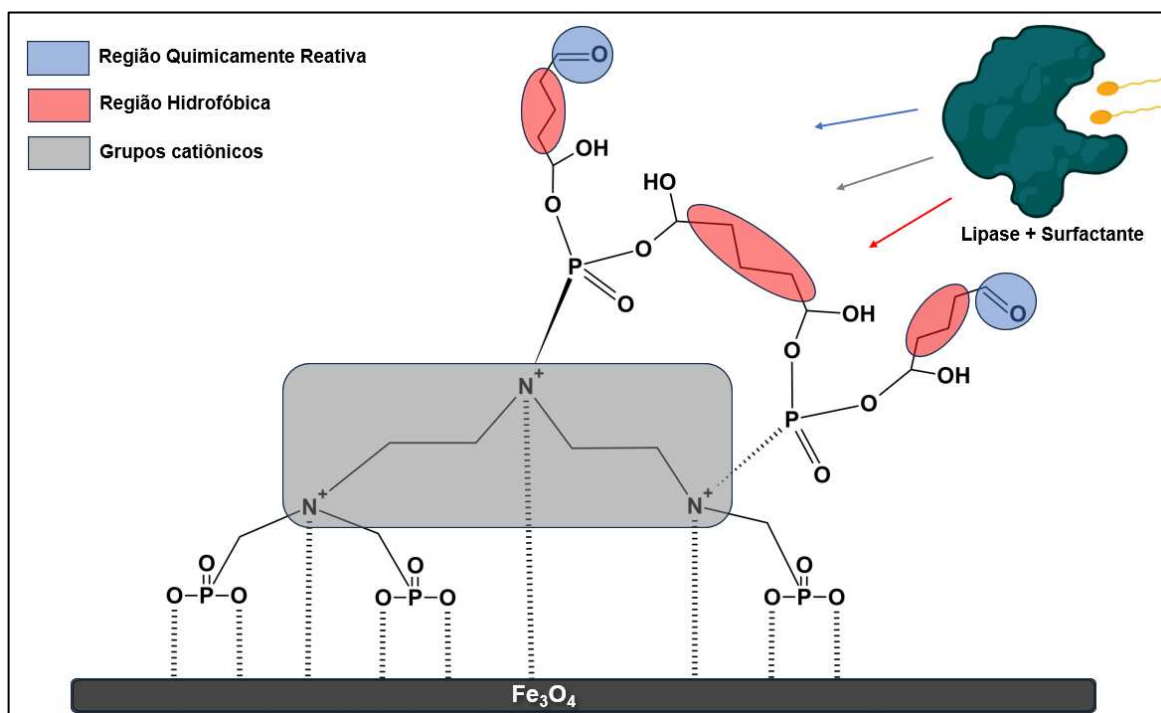


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Imobilização da ET2 em Fe₃O₄@DTPMP-GLU

Após uma análise do suporte Fe₃O₄@DTPMP-GLU, acreditamos que este trata-se de um suporte heterofuncional (MATEO et al., 2000, 2020). Possuindo em sua superfície regiões com grupos catiônicos, frações hidrofóbicas e grupos covalentemente reativos (Figura 12). Estas regiões do suporte são capazes de interagir com diferentes regiões da enzima dependendo das condições reacionais. É possível permitir que uma região de interação seja dominante em relação as outras (MATEO et al., 2007). Adsorções hidrofóbicas são favorecidas em forças iônicas suficientemente altas, podendo ocorrer interações covalentes, caso existam grupos reativos na superfície da enzima após a imobilização (BARBOSA et al., 2014).

Figura 12 – Possíveis regiões de interação entre o suporte Fe₃O₄@DTPMP-GLU e a enzima ET2 na presença de surfactante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

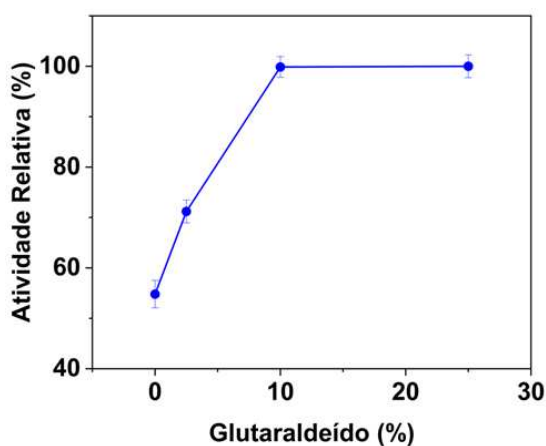
Trocas iônicas entre enzima e suporte são favorecidas em forças iônicas suficientemente baixas (BARBOSA et al., 2012). Nestas condições regiões de interação da enzima contendo nucleófilos, também são capazes de reagir covalentemente com frações de GLU disponíveis (BARBOSA et al., 2014). Vale ressaltar que quanto maior a força iônica, mais restritiva a imobilização se torna, exigindo mais interações entre suporte e enzima (MONTES et al., 2007).

Para maioria das enzimas, interações covalentes ganham destaque em forças iônicas variando entre 100 mM e 250 mM, condições estas que desfavorecem trocas iônicas e não são suficientemente altas para forçar a adsorção hidrofóbica entre enzima e suporte (BARBOSA et al., 2012, 2014). As interações covalentes podem ser associadas a formação de grupos iminas, que ocorre pela interação dos grupos α -amino N-terminal das enzimas e as extremidades das moléculas de GLU, formando o que se chama de base de Schiff (LIMA et al., 2019, 2021).

4.2.1 Efeito da concentração de GLU na atividade da ET2 imobilizada

Ensaio de imobilização enzimática da ET2 em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, utilizando diferentes concentrações de GLU na funcionalização do suporte (0%; 2,5%; 10% e 25%), foram realizados a fim de observar o comportamento da atividade enzimática da ET2 imobilizada nestas condições (Figura 13). Os resultados nos mostram que existe vantagem, em termos de atividade, na utilização do GLU em comparação a sua não utilização, e que a atividade, estabiliza-se em concentrações superiores a 10%. A explicação deste comportamento pode estar associada a saturação de moléculas de GLU na superfície do suporte, fato este relatado por Monsan (1978), que em seu trabalho relaciona a concentração de GLU no suporte com a concentração de carbono encontrada no suporte. Ele afirma que após a ativação, o conteúdo de carbono do suporte aumenta rapidamente com a concentração de GLU e um valor constante é obtido para concentrações de 10% e 20% de GLU. Para a concentração de GLU variando de 0,1% a 10%, há uma relação linear que relaciona o conteúdo de carbono de esferosil ativado ao logaritmo da concentração de GLU (MONSAN, 1978).

Figura 13 – Atividade enzimática do $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$ produzido com suporte ativado em diferentes concentrações de GLU.



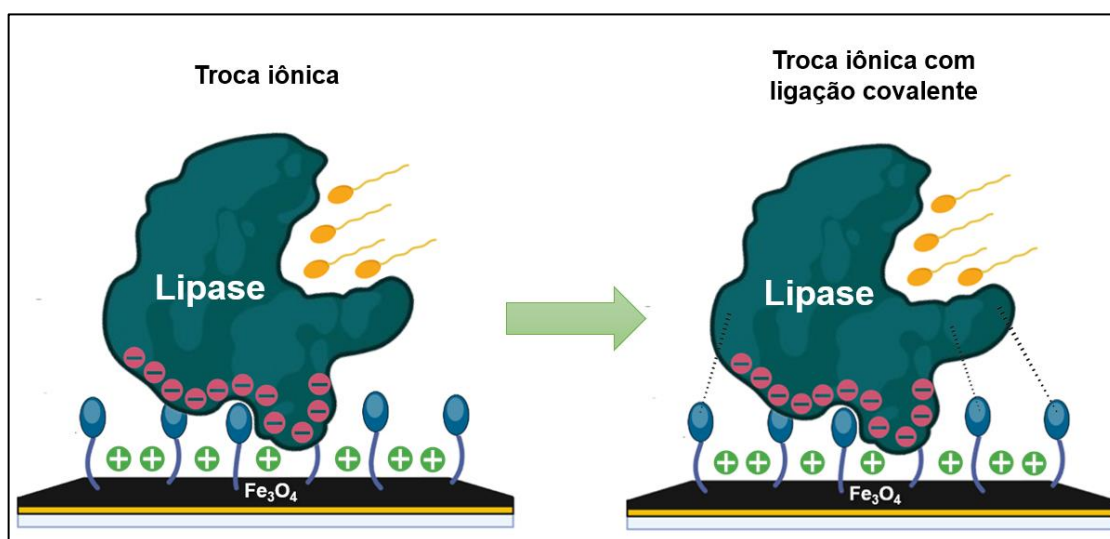
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em concentrações acima de 10%, a atividade não aumenta devido à saturação dos grupos reativos e possível reticulação excessiva (QIAN et al., 2023). Uma alta concentração de reticulante pode ser prejudicial à enzima, pois pode danificar sua flexibilidade e resultar em uma alteração na rigidez. Assim, a reticulação elevada pode diminuir a atividade catalítica devido a possíveis distorções na estrutura da enzima, impedindo que o substrato alcance os sítios ativos e limitando a transferência interna de massa (SILVA et al., 2023; XU et al., 2018).

4.2.2 Utilização de surfactante e possível mecanismo de imobilização da ET2

A utilização de surfactantes não iônicos como Tween 80 e Triton X-100 na imobilização de lipases, geralmente, não gera desnaturação (ZAPPONE; KAZISKA; BOGUSH, 2009), e estes possuem duas principais funções: a exposição do sítio catalítico (BARBOSA et al., 2014) e a quebra de aglomerados enzimático (GUZMAN et al., 2016). Em suportes contendo GLU, caso a imobilização ocorra na presença de Triton X-100 e em baixas forças iônicas (para o presente estudo os valores utilizados foram abaixo de 100 mM), a principal interação existente entre suporte e enzima será através de uma primeira troca iônica, com a possibilidade de interações covalentes caso existam sítios disponíveis para ligação (BARBOSA et al., 2012) (Figura 14). Muito provavelmente uma ou outra causa de imobilização sempre estará presente, seja ela em quantidade maior ou menor (BARBOSA et al., 2014).

Figura 14 – Possíveis interações entre a ET2 e o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ em baixas forças iônicas e na presença de Triton X-100.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 Otimização do processo de imobilização enzimática – Planejamento experimental Taguchi

Com o objetivo de otimizar o processo de imobilização enzimática, o planejamento Taguchi de matriz ortogonal L9 foi utilizado. Este possui vantagens como a possibilidade de identificar e quantificar os efeitos das variáveis independentes escolhidas, dentro dos níveis estabelecidos, através da realização de um número reduzido de experimentos (AMERI et al., 2020; LI et al., 2021; MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020). Após a realização dos experimentos propostos pelo planejamento experimental e tendo em mãos seus resultados em termos de rendimento de imobilização (R.I), atividade teórica (At.T), atividade do derivado (At.D) e atividade recuperada (At.R), construiu-se a Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados dos experimentos de imobilização de ET2 em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ no planejamento experimental Taguchi L9 e razões S/R.

EXPERIMENTO	R.I (%)	At.T (U/g)	At.D (U/g)	At.R (%)	S/R
1	53,44 ± 4,89	12,39 ± 1,13	13,88 ± 1,26	112,08 ± 0,17	22,84
2	72,37 ± 2,44	34,32 ± 1,16	19,51 ± 1,18	56,88 ± 3,31	25,80
3	63,64 ± 0,76	36,01 ± 0,86	17,10 ± 0,33	47,50 ± 0,90	24,65
4	70,82 ± 0,38	31,28 ± 0,17	13,88 ± 1,11	44,33 ± 3,28	22,84
5	60,79 ± 3,75	29,61 ± 1,83	10,98 ± 1,01	37,24 ± 5,13	20,81
6	34,41 ± 4,85	7,82 ± 1,10	3,01 ± 0,40	38,58 ± 0,59	9,57
7	79,33 ± 1,59	40,93 ± 0,82	15,90 ± 1,01	38,88 ± 2,97	24,02
8	61,48 ± 3,64	14,31 ± 0,85	5,60 ± 0,22	39,29 ± 3,85	14,96
9	64,75 ± 1,04	28,91 ± 0,46	5,37 ± 0,37	18,57 ± 1,15	14,59

Fonte: Elaborado pelo autor.

A relação S/R existente, foi calculada pela função “maior é melhor” com o objetivo de maximizar o fator resposta atividade do derivado, já que este trata-se de um dos principais parâmetros a serem avaliados na concepção da imobilização de uma enzima. Devemos, então, interpretar a relação S/R de forma que quanto maior for o seu valor maior será a atividade do

derivado, fato que pode ser facilmente notado ao observar os experimentos 2 e 6, onde temos, respectivamente, a maior e a menor atividade, apresentando valores de $19,51 \pm 1,18$ U/g e $3,01 \pm 0,40$ U/g para At.D, e S/R de 25,80 e 9,57.

4.3.1 Análise da influência das variáveis independentes na atividade da ET2 imobilizada

O método Taguchi utiliza as relações S/R para verificar o efeito de cada variável independente no fator resposta. Para tal, calculamos a variação de S/R entre os níveis de cada variável. Os resultados são interpretados de forma que quanto maior for a variação, mais eficaz será a variável independente na alteração da atividade da ET2 imobilizada. Observando a Tabela 7, podemos notar que o fator mais influente é a carga enzimática, apresentando uma variação de S/R igual a 7,37, seguido por força iônica com valor de 6,97 e tempo 6,69. A variável temperatura apresentou variação de 1,41, sendo este o menor valor expresso, o que nos leva a concluir que os níveis escolhidos não causaram alteração significativa na atividade da ET2 imobilizada.

Melo et al. (2024) também verificou que a carga proteica foi o fator que mais influenciou a imobilização da ET2 no suporte baseado em NPMs híbridas de amina-epóxi núcleo-casca (Fe_3O_4 -PEI-DGEBA: magnetita - polietilenoimina - diglicidil éter bisfenol A). Esse fato pode ser explicado pela ligação covalente multiponto que ocorre devido à superfície do suporte possuir um certo número de sítios de reação livres capazes de imobilizar a ET2 (MELO et al., 2024).

Tabela 7 – Resposta das relações S/R.

NÍVEL	TEMPO (h)	FORÇA IÔNICA (mM)	CARGA ENZIMÁTICA (mg/g)	TEMPERATURA (°C)
1	24,43	23,24	15,79	19,41
2	17,74	20,52	21,08	19,80
3	17,86	16,27	23,16	20,82
VARIAÇÃO	6,69	6,97	7,37	1,41
CLASSIFICAÇÃO	3°	2°	1°	4°

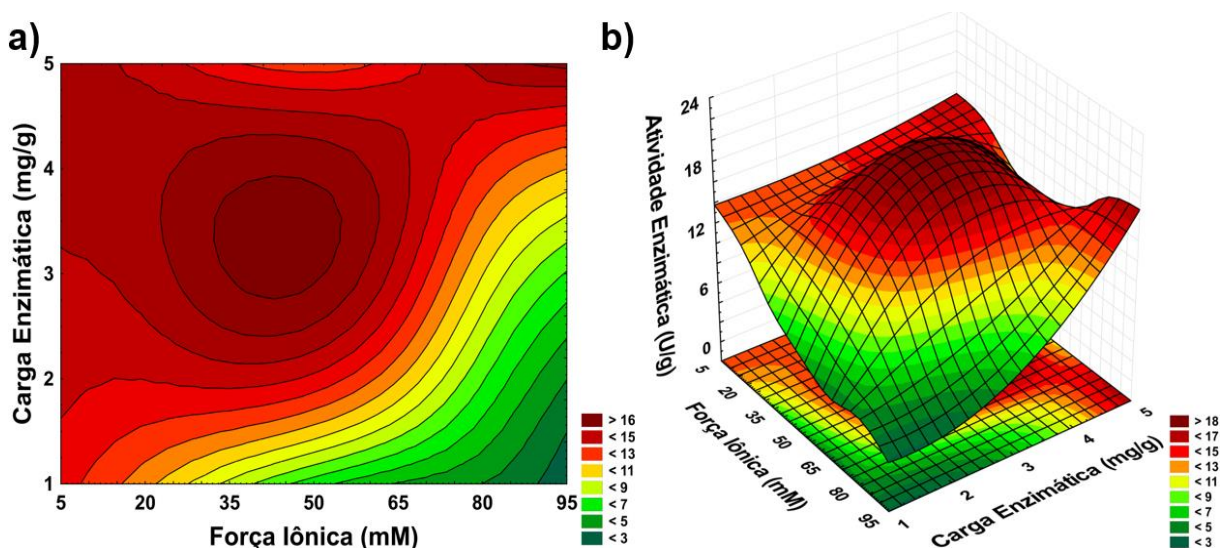
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Análise da interação entre as variáveis independentes de maior influência

O uso de matrizes ortogonais para a investigação do sinergismo entre variáveis independentes é recorrente e estatisticamente indispensável, pois através desta análise podemos avaliar de forma isolada a influência de duas variáveis na atividade da enzima imobilizada (MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020; WANG et al., 2020). A seguir, na Figura 15, são exibidos gráficos de superfície de resposta onde podemos notar a interação dos fatores estudados com maior influência, que são respectivamente, carga enzimática e força iônica.

Ao analisar o gráfico da Figura 15 podemos notar que a região que apresenta maior atividade e, conseqüentemente, maior sinergia entre as variáveis independentes de maior influência, encontra-se próxima a combinação de carga enzimática igual a 3mg/g de suporte e força iônica de 50 mM. Este resultado também pode ser observado ao comparar a atividade obtida no experimento 2 do planejamento experimental ($At.D = 19,51 \pm 1,18$ U/g) com a atividade dos demais experimentos. Importante salientar que na produção de uma enzima imobilizada mais variáveis independentes estão envolvidas e, portanto, estas devem ser analisadas individualmente a fim de otimizar o processo.

Figura 15 – Em a) gráfico de superfície de contorno e b) gráfico de superfície contorno 3D, para a imobilização de Fe_3O_4 -DTPMP-GLU@ET2, demonstram a relação entre carga enzimática (mg/g) e força iônica (mM), considerando a atividade da ET2 imobilizada como resposta.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.3 Análise da significância estatística das variáveis independentes

Objetivando analisar a variabilidade e a significância estatística das variáveis independentes estudadas, tempo (h), força iônica (mM), carga enzimática (mg/g) e temperatura (°C), a ferramenta de análise de variância (ANOVA) foi utilizada. Para tal, a variável independente de menor influência no fator resposta (atividade da ET2 imobilizada) foi retirada, a fim de disponibilizar os graus de liberdade necessários para realização dos cálculos. Com o intuito de compreender os resultados obtidos (Tabela 8), dois valores devem ser destacados, sendo estes valor-F e valor-p (DHAWANE; CHOWDHURY; HALDER, 2019; FORTES et al., 2017; SYUKRI et al., 2021; ZHENG et al., 2016).

O valor-F representa a razão da variabilidade entre os níveis em relação a variabilidade dentro dos níveis para a variável independente em estudo. Seu valor deve ser interpretado de forma que quanto maior for, maior será a variabilidade entre os níveis em relação a variabilidade esperada somente pelo acaso, sugerindo uma diferença estatística entre as atividades da ET2 imobilizada, obtidas para cada nível. Para confirmar esta diferença devemos analisar o valor-p, que indica se o valor-F é suficientemente grande para negar a hipótese nula (H_0), que afirma não existir diferença significativa dentro de um conjunto de dados. Para que hipótese nula (H_0) seja negada apresentando um intervalo de confiança de 95%, o valor-p deve ser inferior a 0,05 (FORTES et al., 2017; SYUKRI et al., 2021; WANG et al., 2016; ZHENG et al., 2016).

Tabela 8 – Análise de Variância (ANOVA).

FATOR	SS	DF	MS	VALOR-F	VALOR-p
TEMPO	88,03	2	44,01	27,84	0,034
FORÇA IÔNICA	73,93	2	36,96	23,37	0,041
CARGA ENZIMÁTICA	86,67	2	43,33	27,40	0,035
TEMPERATURA	-	-	-	-	-
RESÍDUO	3,16	2	1,58		
TOTAL	251,80	6			

Fonte: Elaborado pelo autor.

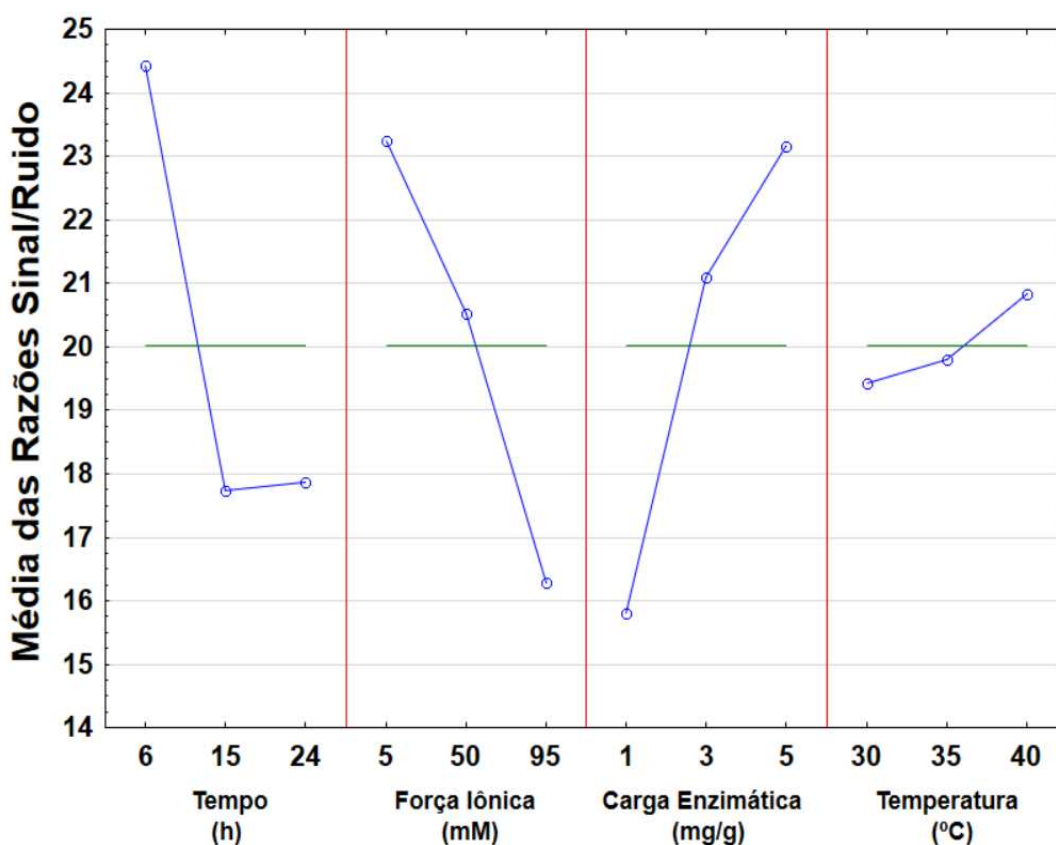
É possível ver que existe uma relação direta entre o valor-F e o valor-p, mostrando que quanto maior for o valor-F menor será o valor-p. Então a partir dos resultados apresentados,

podemos concluir que a variações dos valores das variáveis independentes tempo (h), força iônica (mM), carga enzimática (mg/g) ocasionam diferenças significativas nos valores de atividade.

4.3.4 Condições ótimas de imobilização

As condições ótimas de imobilização da lipase ET2 no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ foram definidas baseando-se nos valores das relações S/R para cada nível (1, 2 e 3) das variáveis independentes (tempo, força iônica, carga enzimática e temperatura) estudadas no planejamento experimental Taguchi (Figura 16). Sabemos que a magnitude do fator resposta (atividade do catalisador) está relacionada de forma direta com a relação S/R, de forma que quanto maior for o valor de S/R maior será o valor do fator resposta.

Figura 16 – Efeito das variáveis independentes em termos de relações S/R.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Então para se estabelecer as condições ótimas de imobilização devemos escolher o nível que apresenta o maior valor da relação S/R para cada variável independente. Podemos observar

na Tabela 9, a combinação entre os níveis estudados que maximizam a atividade da imobilização da ET2.

Tabela 9 – Condições ótimas de imobilização da ET2.

FATOR	TEMPO (h)	FORÇA IÔNICA (mM)	CARGA ENZIMÁTICA (mg/g)	TEMPERATURA (°C)
NÍVEL	1	1	3	3
VALOR DO NÍVEL	6	5	5	40

Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o auxílio do software Minitab® e utilizando as relações S/R dos níveis ótimos, calculamos a intensidade teórica para o fator resposta (atividade da ET2 imobilizada), e o valor de 23,16 U/g foi encontrado. Ao realizarmos testes experimentais obtivemos o resultado de $21,79 \pm 0,93$ U/g que representa 94% do valor teórico, mostrando assim reprodutibilidade e robustez da imobilização da lipase ET2 no suporte Fe₃O₄-DTPMP-GLU.

4.4 Estabilidade da ET2 imobilizada

4.4.1 Análise do processo de dessorção da ET2 imobilizada

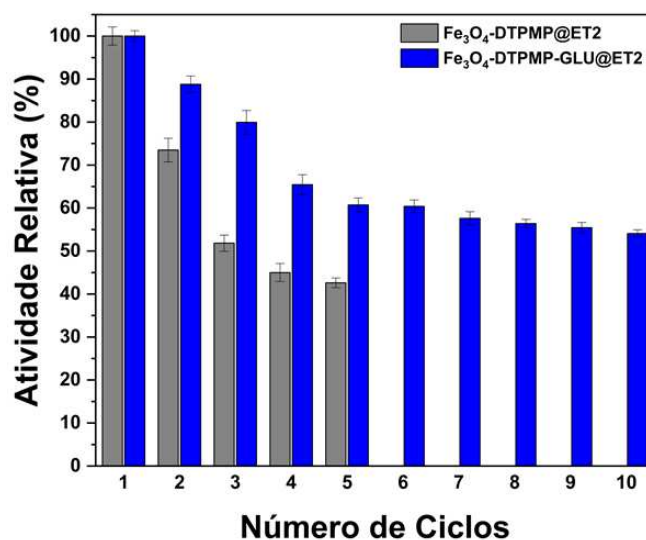
O ensaio de dessorção revelou que não houve desprendimento da ET2 do suporte na presença de PBS (25 mM e pH 7), NaCl 1 M e Triton X-100 a 0,1% (v/v), mesmo após 60 min. Portanto, a ET2 está fortemente ligada ao suporte Fe₃O₄@DTPMP-GLU. Sousa et al. (2024) e Zaak et al. (2017) também verificaram que o GLU impediu o desprendimento da enzima do suporte.

4.4.2 Estabilidade operacional em ciclos de reuso

A Figura 17 esboça a atividade da ET2 imobilizada avaliada em 10 ciclos de reuso. A reutilização serve como um meio de compensar o custo mais alto das enzimas imobilizadas em comparação aos catalisadores químicos (ATİROĞLU, 2020; BABAKI et al., 2015). Foi possível realizar dez ciclos com o Fe₃O₄-DTPMP-GLU@ET2 sem que a atividade relativa

caísse abaixo de 50%, mostrando que houve uma desativação mais rápida da ET2 no $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP@ET2}$. Para o $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$ foi estabelecido um rendimento de 100% em seu primeiro ciclo de reuso e após 5 ciclos, o rendimento caiu para 60,74%. A lipase imobilizada manteve 54,08% da atividade após 10 ciclos, desempenho comparável ao de sistemas comerciais, como o Novozym 435, que apresentam quedas semelhantes após múltiplos usos. Esse resultado evidencia a viabilidade econômica do suporte, pois permite sua reutilização sem reposição imediata, característica essencial em processos industriais.

Figura 17 – Estabilidade em ciclos de reuso do $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP@ET2}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$ ativado com 2,5% de GLU, ambos produzidos nas condições ótimas de imobilização e com suas atividades iniciais estabelecidas como 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Santos et al. (2024) imobilizaram ET2 em NPMs de Fe_3O_4 para sintetizar oleato de etila usando a esterificação de ácido oleico com etanol. Eles observaram um declínio gradual a partir do 5º ciclo, caindo para 39,9% no ciclo final. Brandão Júnior et al. (2023) imobilizaram ET2 em NPMs de Fe_3O_4 para produzir ésteres metílicos e etílicos de óleos de babaçu e tucumã. Uma diminuição sutil na atividade catalítica foi observada ao longo de três ciclos de reutilização e sem perda significativa de catalisador. Os resultados variaram de 68,7% a 82,2% para babaçu e de 32,5% a 86,0% para tucumã. Usando ET2 imobilizada no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-DGEB}$, Melo et al. (2024) realizaram 10 ciclos de reutilização para a esterificação de ácidos graxos livres de óleo de babaçu. Eles obtiveram um rendimento de 74,86%, que reduziu para 52,86% após 10 ciclos.

4.4.3 Carga máxima de imobilização enzimática

A Figura 18 indica a capacidade máxima de carga do ET2 que pode interagir eficientemente com o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, levando em consideração o rendimento de imobilização e a atividade relativa da ET2 imobilizada. A carga enzimática excessiva pode causar interação proteína-proteína, inibindo o alongamento flexível da conformação enzimática. Assim, a identificação precisa da capacidade máxima do suporte permite verificar se houve inativação por impedimento estérico causado pela formação de multicamadas enzimáticas. A limitação da difusão também deve ser considerada (CAVALCANTE et al., 2022). Ao trabalhar com nanosuportes, especialmente paramagnéticos e ferromagnéticos, a aglomeração de partículas individuais é um fenômeno frequentemente observado. No entanto, quando comparados a suportes porosos, esses aglomerados podem apresentar menor limitação à difusão (LIESE; HILTERHAUS, 2013).

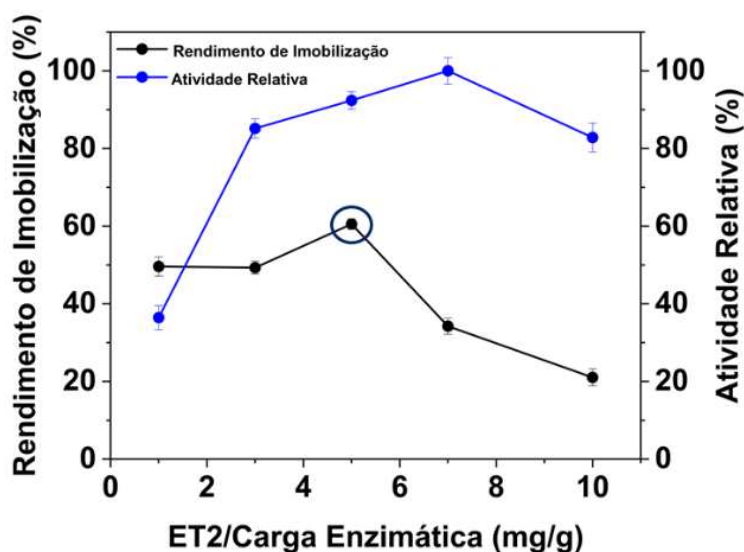
A capacidade máxima do suporte foi de 5mg/g de suporte, com um rendimento acima de 60%. Em cargas inferiores e superiores a 5mg/g de suporte, menos de 50% da enzima é imobilizada ao suporte, sendo obtidos rendimentos de imobilização insatisfatórios. O aumento da carga enzimática oferecida ao suporte provoca um aumento na atividade relativa da ET2 imobilizada até atingir o máximo no ponto 7mg/g. Após o ponto 7mg/g de suporte tem-se uma redução significativa da atividade relativa.

Portanto, a carga máxima de ET2 a ser usada para aproveitar ao máximo o suporte, foi alcançada em 5mg de ET2/g de suporte com um R.I de $60,53\% \pm 1,37$ e atividade relativa de $92,37\% \pm 2,26$, mostrando que o suporte favorece a preservação estrutural da enzima. Em comparação, o artigo de revisão de Bilal et al. (2018) relata quedas de até 40% de atividade dos suportes magnéticos convencionais. Assim, o resultado do nosso estudo destaca o diferencial do suporte heterofuncional, que concilia eficiência de ancoragem com manutenção da atividade catalítica.

Ao imobilizar a ET2, a mesma capacidade máxima de suporte (5 mg/g de suporte) foi relatada por Melo et al. (2024) (suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-DGEBA}$, R.I = $95,04 \pm 0,79$) e Sousa et al. (2024) (suporte Quitosana/Agarose/GLU, R.I = $74,20 \pm 0,28$). Sousa et al. (2024) desenvolveram um suporte híbrido consistindo de quitosana e agarose, e ativado com GLU, sendo que o maior R.I ($88,88\% \pm 0,36$) foi alcançado para 1 mg de ET2/g de suporte, mas com uma atividade relativa muito baixa (aproximadamente 35%). A imobilização de enzimas em NPs é de interesse para impulsionar suas aplicações catalíticas, mas abordagens racionais para

projetos que alcançam alta carga e ativação de enzimas continuam sendo um desafio (WAN et al., 2024). Deve ser ressaltado que cargas elevadas podem gerar deficiência estérica e inativação das moléculas enzimáticas, pois ocorre a formação de conglomerados que inibem o alongamento elástico da conformação enzimática (MOREIRA et al., 2022; ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

Figura 18 – Capacidade máxima de carga enzimática de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$ ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização.



Fonte: Elaborado pelo autor.

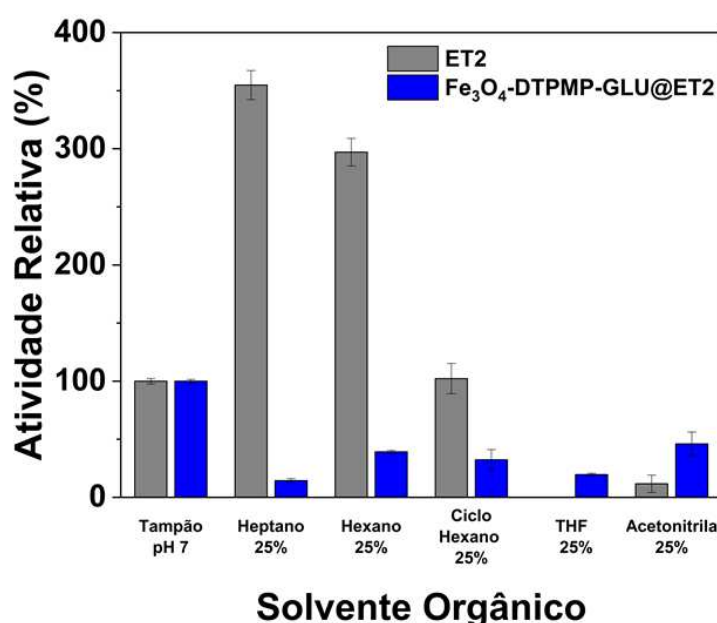
4.4.4 Estabilidade em solventes orgânicos

O uso de solventes orgânicos como meios de reação para reações enzimáticas fornece inúmeras vantagens industrialmente atraentes em comparação aos sistemas tradicionais de reação aquosa, mas há alguns problemas inerentes, incluindo a inativação das enzimas (DOUKYU; OGINO, 2010). Uma das propriedades únicas das lipases inclui a estabilidade da atividade catalítica em solventes orgânicos (ALI et al., 2023). Interações diretas entre as moléculas de solvente e da enzima podem fornecer diferenças na atividade em diferentes solventes (WONGWATANAPAIBOON et al., 2016).

A Figura 19 revela a verificação da tolerância da ET2 e do $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$ em cinco diferentes solventes orgânicos, mostrando um comportamento seletivo da lipase ET2 imobilizada no suporte. Enquanto solventes apolares, como hexano, heptano e ciclo-hexano,

resultaram em redução da atividade catalítica, a presença de acetonitrila e THF promoveu um efeito positivo, aumentando a atividade relativa da enzima. Embora em alguns momentos o $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$ tenha apresentado atividade superior quando comparado à enzima livre, ele não apresentou aumento da atividade em solventes orgânicos. Os solventes orgânicos podem se ligar competitivamente aos sítios ativos da enzima, sendo que a maioria dos solventes orgânicos polares pode penetrar no sítio ativo das enzimas (NIAN; LI, 2022).

Figura 19 – Estabilidade em solventes orgânicos de ET2 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização com suas atividades em tampão pH 7 estabelecidas como 100%.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em heptano, hexano e ciclo hexano, a atividade foi muito maior, provavelmente por conta da exposição do sítio catalítico da ET2 (tampa da lipase), que é uma região hidrofóbica, levando a um sítio ativo mais acessível. A composição específica do resíduo da tampa e a polaridade do solvente influenciam diretamente o movimento da tampa da enzima. Solventes apolares, como o hexano, favorecem a conformação aberta da tampa (KHAN et al., 2017). A atividade das lipases é mantida por certas quantidades de água que formam uma camada de hidratação na superfície, e a natureza hidrofóbica do hexano mantém a enzima em um estado hidratado (SOWAN et al., 2023).

Importante destacar que a estabilidade da enzima incorporada ao suporte foi melhorada contra os agentes desnaturantes acetonitrila e THF, criando assim a perspectiva de aplicações

que envolvem o uso destes solventes (GREIFENSTEIN et al., 2022). A atividade aumentada em acetonitrila e THF sugere que solventes moderadamente polares modulam a conformação da lipase, reduzindo rigidez e favorecendo o acesso ao sítio ativo. A acetonitrila, por exemplo, é conhecida por reduzir interações hidrofóbicas excessivas e favorecer o acesso do substrato ao sítio ativo, prevenindo rigidez estrutural. O mesmo raciocínio pode ser aplicado ao THF, que, pela sua polaridade intermediária, atua como modulador de microambiente, conferindo maior flexibilidade à enzima imobilizada. Esse comportamento já foi descrito para lipases de *Thermomyces lanuginosus* (BILAL et al., 2018), mas é aqui relatado pela primeira vez para a ET2 em suporte heterofuncional. Assim, a observação reforça a singularidade do sistema proposto, evidenciando que a funcionalização combinada com DTPMP e GLU não apenas estabiliza a enzima, mas também permite respostas adaptativas a solventes específicos. Essa resposta adaptativa amplia a aplicabilidade do biocatalisador em síntese orgânica não aquosa e processos de transesterificação. Segundo Remonatto et al. (2022), para obter alta eficiência catalítica em reações catalisadas por lipases imobilizadas na presença de solventes orgânicos também é necessário a otimização das condições de reação.

Do ponto de vista industrial, esse resultado é altamente relevante. A presença de solventes orgânicos é comum em processos de síntese verde, especialmente em reações de transesterificação e biocatálise em meio não aquoso. Portanto, a capacidade de manter ou até aumentar a atividade em acetonitrila e THF destaca o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ como uma plataforma competitiva frente a suportes tradicionais, ampliando suas possibilidades de aplicação prática.

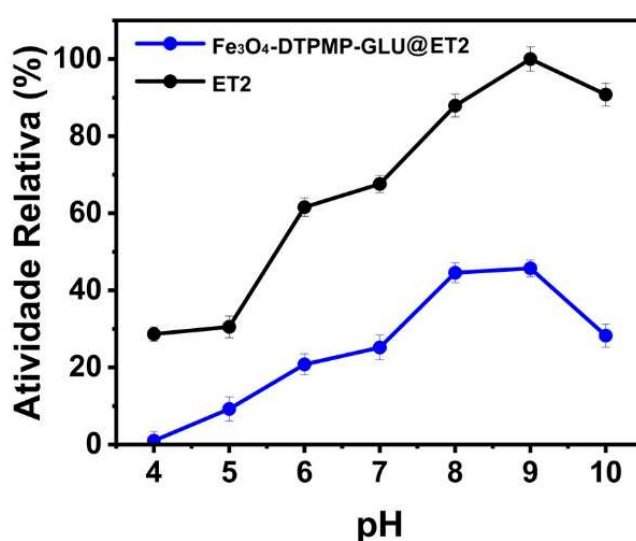
4.4.5 Estabilidade em pH

A Figura 20 destaca o efeito do pH no desempenho da ET2 em uma faixa de valores de 4 a 10. A atividade hidrolítica máxima para ET2 livre e imobilizada foi em pH 9. O procedimento de imobilização não contribuiu para o aumento da atividade enzimática em nenhum dos pHs estudados. As lipases imobilizadas em suportes orgânicos, inorgânicos ou híbridos costumam apresentar aumento de atividade em pHs entre 7 e 10 (MELO et al., 2024; VILLENEUVE et al., 2000). No entanto, neste trabalho o suporte não conferiu tal característica.

Este comportamento pode estar relacionado com os vários fatores associados à imobilização, como mudanças na conformação enzimática, interações específicas entre a

enzima e o suporte. Além disso, o microambiente químico gerado pelos grupos fosfonato no suporte pode alterar os valores ideais de pH (MELO et al., 2024). Independentemente do método escolhido para imobilização, a molécula da enzima interage com um ambiente molecular que pode ser muito diferente daquele em seu estado nativo. Isso pode afetar a atividade catalítica devido à alteração da integridade conformacional da enzima (ATİROĞLU, 2020).

Figura 20 – Estabilidade de ET2 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização em diferentes faixas de pH.

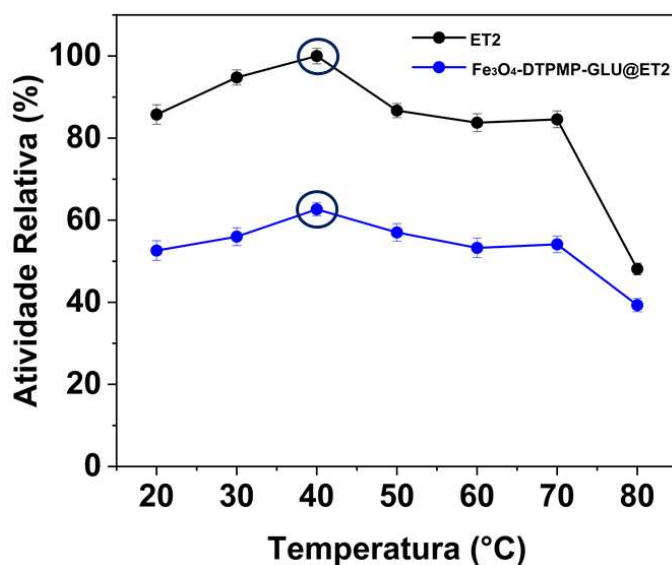


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4.6 Estabilidade térmica

A Figura 21 reflete o comportamento da desativação térmica da ET2 livre e imobilizada em diferentes temperaturas. A ET2 livre e a imobilizada apresentaram suas maiores atividades a 40 °C. A ET2 apresentou queda pouco acentuada de sua atividade em temperaturas acima de 40 °C até 70 °C, resultado contrário ao observado em estudos utilizando ET2 (MELO et al., 2024; SOUSA et al., 2024). Além disso, o suporte deste trabalho não contribuiu para o aumento da estabilidade térmica da ET2, com melhores atividades de imobilização em temperaturas acima de 40 °C, quando comparado à enzima livre, possivelmente devido à falta de múltiplos pontos de ancoragem (KUJAWA et al., 2022; RODRIGUES et al., 2021). Comparada com a lipase livre, a lipase imobilizada costuma apresentar estabilidade térmica aprimorada (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

Figura 21 – Estabilidade térmica de ET2 e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU@ET2}$, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Melo et al. (2024) demonstraram que o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-DGEBA}$ contribuiu para o aumento da estabilidade térmica da ET2 por meio de ligações multiponto. Sousa et al. (2024) imobilizaram a ET2 por meio de ligação covalente em um suporte híbrido composto de quitosana e agarose, que foi ativado com GLU, o que também contribuiu para o aumento da estabilidade térmica da lipase. Carballares et al. (2024) verificaram que a ET2 adsorvida no GLU do suporte produz uma estabilização significativa da enzima, maior do que a obtida com suportes pré-ativados com MANAE-GLU-GLU, resultando em uma estabilidade térmica da ET2 ainda menor do que a da enzima adsorvida apenas ionicamente.

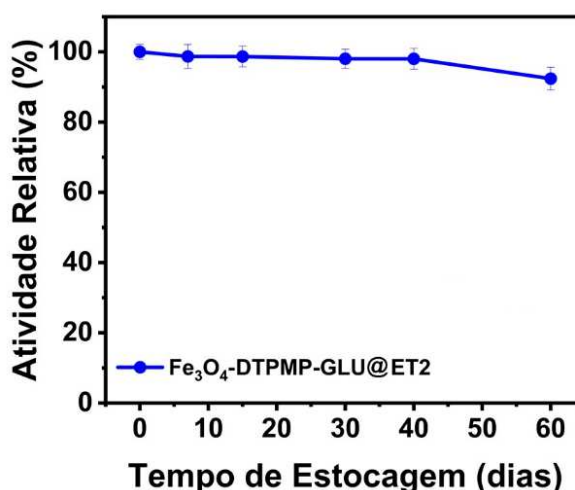
4.4.7 Estabilidade de armazenamento

Uma característica essencial que impacta o custo dos processos industriais é a estabilidade da enzima durante o armazenamento (ATİROĞLU, 2020). A enzima em sua forma livre geralmente não é estável durante o armazenamento, perdendo gradualmente sua atividade ao longo do tempo (MELO et al., 2024). A Figura 22 indica a evolução da atividade ao longo de 60 dias para a ET2 imobilizada no suporte, que apresentou uma atividade relativa de 92,37%. Portanto, o suporte provavelmente estabilizou a forma livre ativa da ET2 e reduziu a influência da autólise. Os resultados, aqui apresentados, são superiores aos relatados por Sousa et al.

(2024), nos quais 84,7 % da atividade da ET2 imobilizada em suporte de Quitosana/Agarose/GLU/GLU foi retida após 61 dias. Melo et al. (2024) relataram uma atividade relativa de 90,46% (60 dias) pela imobilização da ET2 no suporte Fe_3O_4 -PEI-DGEBA.

O biocatalisador manteve atividade significativa após 60 dias a 4 °C, indicando estabilidade de médio prazo. Embora alguns suportes relatados na literatura exibam maior tempo de conservação Zdarta et al. (2018), a simplicidade de síntese do sistema e sua estabilidade obtida o tornam competitivo para aplicações em biocatálise contínua.

Figura 22 – Estabilidade de armazenamento do Fe_3O_4 -DTPMP-GLU@ET2 durante 60 dias, armazenado a 4 °C, ativado com 2,5% de GLU e produzido nas condições ótimas de imobilização.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5 Caracterização dos Materiais

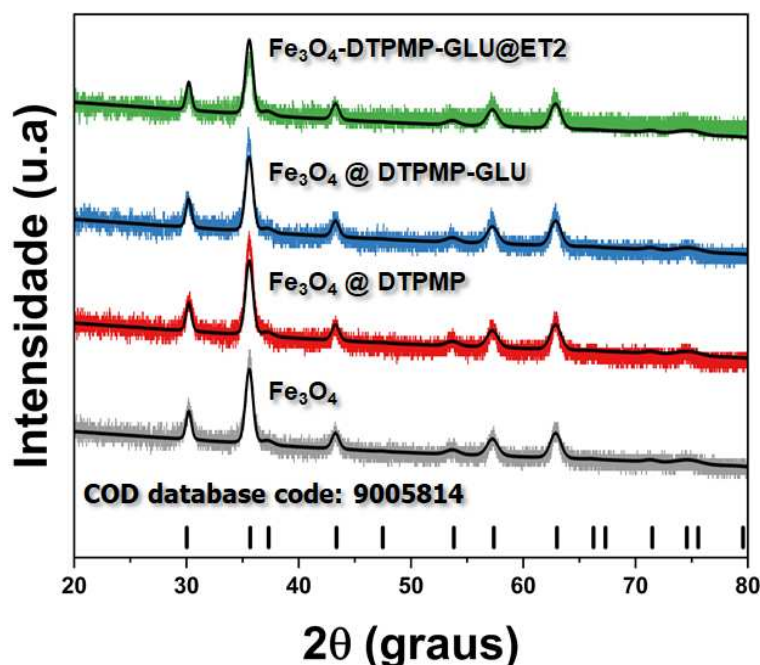
4.5.1 Espectroscopia de Difração de Raios-X (XRD)

Os padrões de XRD para os materiais sintetizados são apresentados na Figura 23. Os pontos cinza, vermelho, azul e verde mostram os dados experimentais para as amostras, enquanto as linhas pretas são o difratograma ajustado de acordo com o refinamento de Rietveld. A análise da posição e intensidade dos picos de difração confirmou que todas as amostras sintetizadas são compostas de uma única fase cristalina com uma estrutura espinélio cúbico inverso – $\text{Fd}3\text{m}$ (CIF n. 9005814), característico de Fe_3O_4 (IYENGAR et al., 2014). Este resultado confirma que a estrutura cristalina da magnetita foi preservada após a funcionalização, garantindo propriedades magnéticas.

Na Tabela 10 são apresentados os parâmetros de refinamento Rietveld para cada material produzido. O parâmetro R_{wp} foi usado como critério numérico da qualidade do ajuste calculado para os dados experimentais (SILVA et al., 2025). O tamanho médio do cristalito obtido neste trabalho para o Fe_3O_4 foi da ordem de $17,2 \pm 0,8$ nm. As NPs sintetizadas se comportam como partículas de domínio único na faixa de 14 nm – 36 nm. Elas mostram propriedades superparamagnéticas se as partículas forem menores que 14 nm e propriedades multidomínio quando as partículas forem maiores que 36 nm.

Os materiais superparamagnéticos possuem a capacidade de se tornarem altamente magnetizados apenas na presença de um campo magnético (UPADHYAY; PAREKH; PANDEY, 2016). Em particular, o impacto dos tamanhos de cristalito dos óxidos de ferro é pouco abordado até o momento. Como um óxido redutível, ele pode exercer um impacto nas interações metal-suporte, que influencia o desempenho catalítico de catalisadores. Os tamanhos de cristalito da maioria dos óxidos de ferro caem na faixa de várias dezenas de nanômetros, sendo o uso de cristais maiores extremamente raro (TAN et al., 2024).

Figura 23 – Difratogramas das amostras Fe_3O_4 -DTPMP-GLU@ET2, Fe_3O_4 @DTPMP-GLU, Fe_3O_4 @DTPMP e Fe_3O_4 .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 10 – Parâmetros estatísticos obtidos pelo refinamento Rietveld das amostras em estudo.

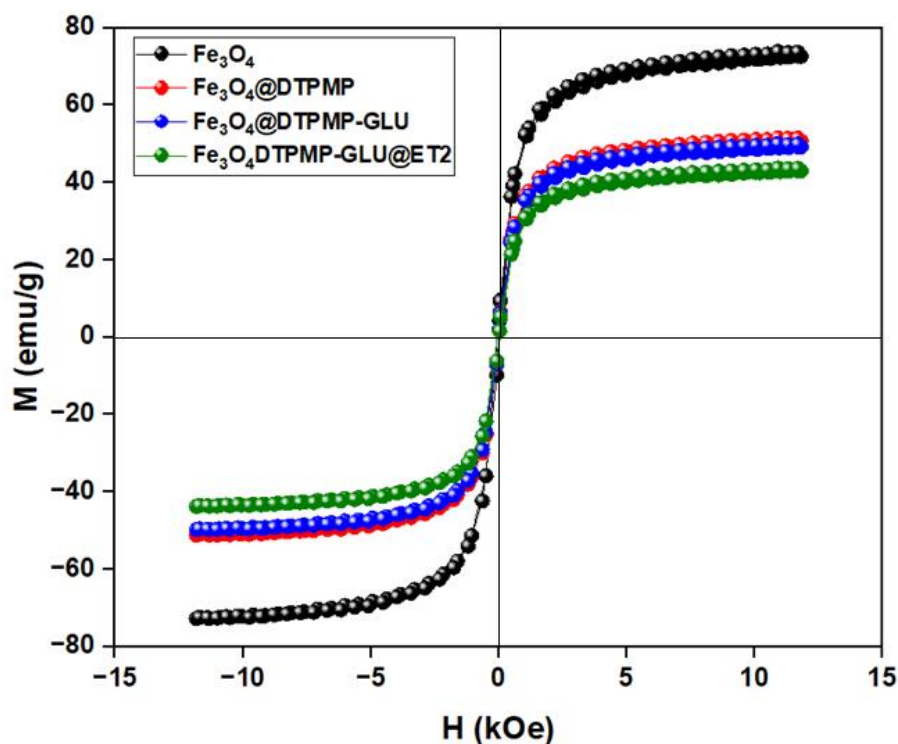
Amostra	R _{wp} (%)	Parâmetro cristalográfico (a=b=c=Å)	Tamanho do cristalito (nm)
Fe ₃ O ₄	2,95	a = 8,38	16,8±0,4
Fe ₃ O ₄ @DTPMP	3,08	a = 8,38	18,7±0,6
Fe ₃ O ₄ @DTPMP-GLU	2,81	a = 8,38	17,1±0,4
Fe ₃ O ₄ -DTPMP-GLU@ET2	8,57	a = 8,38	16,0±1,7

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.5.2 Magnetômetro de amostra vibrante (VSM)

A Figura 24 mostra a magnetização dependente do campo (curva M–H) dos materiais. O *loop* M–H mostra histerese mínima, ou seja, remanência e coercividade próxima a zero, indicando a presença de NPs de Fe₃O₄ superparamagnéticas e de domínio único (UPADHYAY; PAREKH; PANDEY, 2016). A saturação de magnetização para o Fe₃O₄ foi 73,83 emu/g, sendo este valor similar ao reportado por Melo et al. (2024).

Figura 24 – Curvas de histerese magnética dos materiais em suas diferentes etapas de recobrimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As amostras $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@\text{ET2}$ apresentaram magnetizações de 51,58, 49,99 e 43,70 emu/g, respectivamente. Esses resultados demonstram que a superfície de Fe_3O_4 contém elementos não magnéticos. A esse respeito, com a amostra $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@\text{ET2}$ apresentou o menor valor de magnetização, podemos assumir que a imobilização ET2 foi bem-sucedida no suporte heterofuncional. Assim, o VSM mostra leve redução na magnetização, coerente com o recobrimento orgânico, mas mantendo a responsividade magnética necessária.

4.5.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR-spectra)

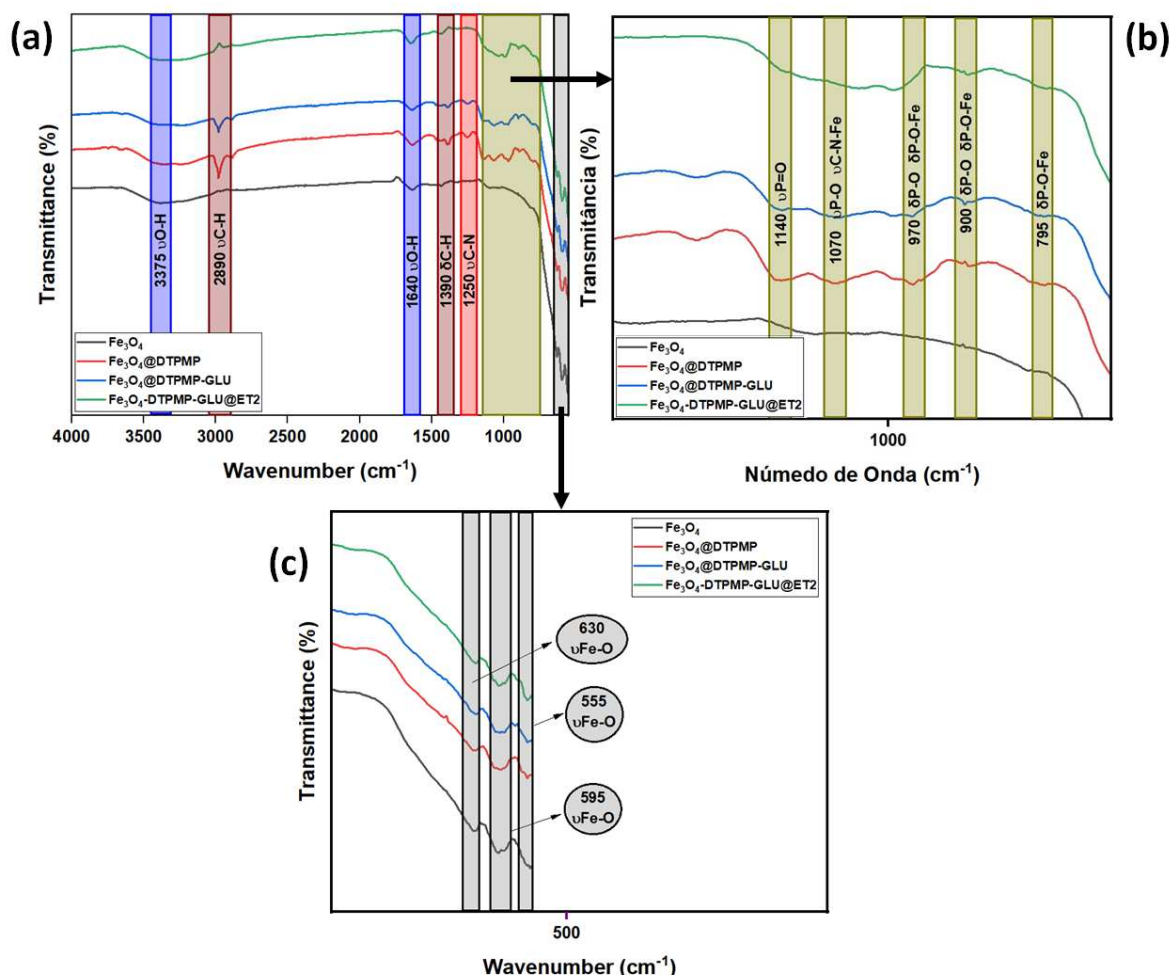
A Figura 25 exhibe os modos vibracionais encontrados para as amostras após as análises com FTIR, destacando informações sobre as ligações presentes na estrutura dos materiais. Os espectros na Figura 25 (a) não apresentam bandas de carbonila (C=O), normalmente encontradas por volta de 1700. Este fato pode ser explicado para $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, por que a amostra é seca para análise. De acordo com Mohammed et al. (2015), no estado sólido (sem água) a forma enólica é favorecida (deslocamento do equilíbrio), o que pode ser explicado pela formação de ligação de hidrogênio intramolecular. No $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@\text{ET2}$ não encontramos C=O por que provavelmente está se ligando a enzima e formando a base de *Schiff* (iminas), como a enzima é uma estrutura complexa fica difícil a visualização.

Todos os espectros apresentaram uma banda na faixa de 600 cm^{-1} (630 cm^{-1} , 555 cm^{-1} , 595 cm^{-1}) como evidencia a Figura 25 (c), característica das vibrações da ligação simples Fe-O nas fases $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 , indicando que os materiais sintetizados consistem em Fe_3O_4 parcialmente oxidado (MELO et al., 2024; ZHANG et al., 2019). Nessa banda, verifica-se que a magnetita permaneceu após funcionalização com DTPMP, ativação com GLU e imobilização do ET2. As bandas em 1640 cm^{-1} e 3375 cm^{-1} , relativas as vibrações da ligação simples O-H , também permaneceram (DEHSARI et al., 2018).

Como mostra a Figura 25 (b), a funcionalização do Fe_3O_4 com DTPMP pode ser observada no aparecimento dos seguintes modos vibracionais de alongamento em 1140 cm^{-1} ($\nu\text{ P=O}$), 1070 cm^{-1} ($\nu\text{ P-O}$ e $\nu\text{ C-N-Fe}$) (NETO et al., 2021), e vibrações de deformação angular em 795 cm^{-1} ($\delta\text{ P-O-Fe}$), 970 cm^{-1} e 900 cm^{-1} ($\delta\text{ P-O}$ e $\delta\text{ P-O-Fe}$). Podemos atribuir a banda em 1250 cm^{-1} à vibração de alongamento da ligação simples C-N e em 1390 cm^{-1} e 2890 cm^{-1}

à vibração de flexão da ligação simples C–H (NETO et al., 2021). Portanto, o FTIR evidencia a presença de grupos fosfonato e ligações covalentes formadas na imobilização.

Figura 25 – Bandas de FTIR dos materiais em suas diferentes etapas de recobrimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

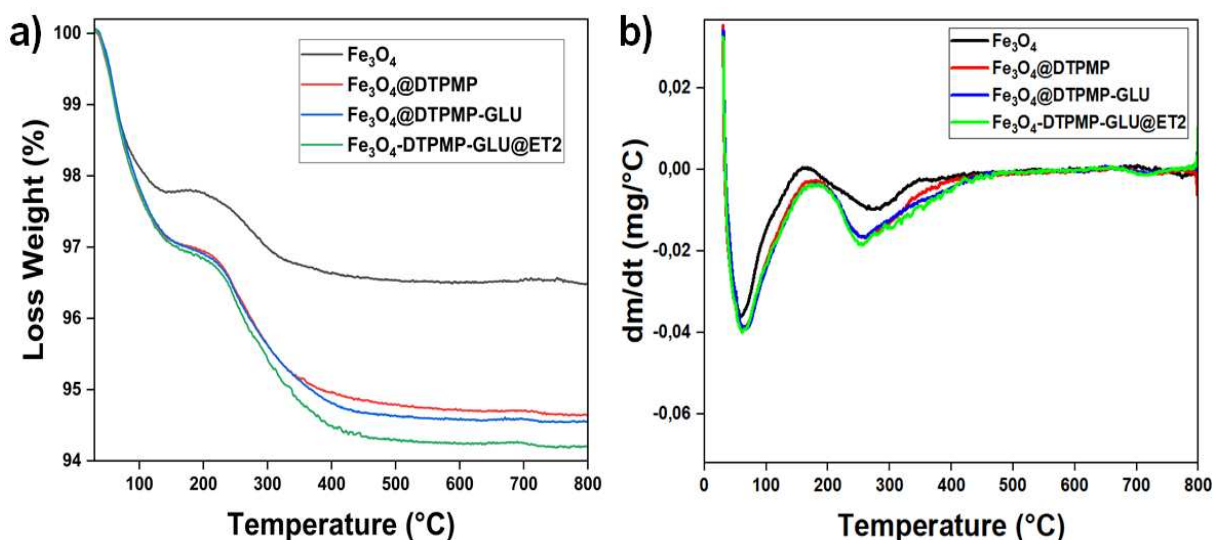
4.5.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

O TGA das amostras e suas respectivas curvas diferenciais (DTG) são apresentadas na Figura 26 (a) e (b), que confirma aumento da fração orgânica, consistente com a funcionalização. A decomposição térmica dos materiais é dividida em 2 estágios. Durante a fase inicial, em temperaturas por volta de 60 °C, os materiais apresentaram uma perda de peso de 2,23% (Fe_3O_4), 3,0% ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$), 3,03% ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$) e 3,08% ($\text{Fe}_3\text{O}_4-\text{DTPMP-GLU}@ET2$), devido à evaporação da água absorvida dentro dos materiais.

O aumento da perda de massa está associado ao conteúdo orgânico/enxertado (DTPMP + GLU + ET2). Após isso, em 275 °C temos um novo evento térmico, onde o Fe_3O_4 permanece em um processo contínuo de perda de massa, estabilizando-se em uma perda de aproximadamente 3,52 %. Melo et al. (2024) obteve um evento de perda de massa inicial de 3% em torno de 80 °C para o Fe_3O_4 , em seu segundo estágio uma perda maior, de aproximadamente 12,5 % em torno de 500 °C. Deve ser ressaltado que o autor trabalhou com o método sonoquímico com condições um pouco diferentes.

$\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ e $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$ continuaram sofrendo decomposição, porém com taxa máxima em torno de 255 °C, mas com perdas próximas ao do Fe_3O_4 , que se estabilizam em 5,36%, 5,45% e 5,80%, respectivamente, o que demonstra a natureza de alta estabilidade. A perda máxima de peso foi observada para $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$, que pode estar relacionada à quantidade mais substancial de materiais orgânicos incorporados e enzimas imobilizadas (CAVALCANTE et al., 2022).

Figura 26 – a) Análise termogravimétrica e b) termogravimétrica-diferencial, ambas dos materiais em suas diferentes etapas de recobrimento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

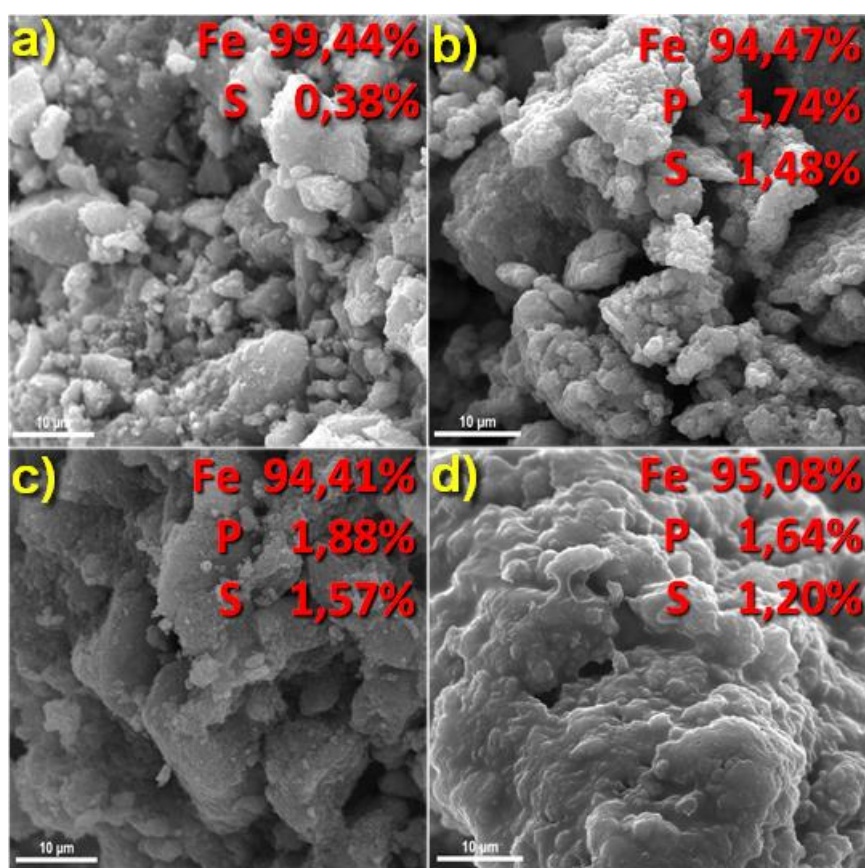
4.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) e Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X (XRF)

A Figura 27 exhibe as micrografias de varredura das amostras e os mapas de XRF (inserções), que revelam mudanças de morfologia e composição química, validando o recobrimento e a ancoragem da enzima. Todas as imagens mostraram uma morfologia de

superfície laminar. A diferença na rugosidade dos materiais indica uma ligeira mudança na composição do material.

Os espectros XRF mostram pequenas variações nas composições elementares, indicando pequenas diminuições nos átomos de Fe, com o aparecimento e aumento do fósforo (P), demonstrando que o suporte está sendo reforçado com material adicional. A presença de S (enxofre) no Fe_3O_4 pode ser atribuída ao material de partida utilizado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).

Figura 27 – SEM/XRF e espectros elementares a) Fe_3O_4 ; b) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$; c) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ e d) $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-DTPMP-GLU}@ET2$.



Fonte: Elaborado pelo autor.

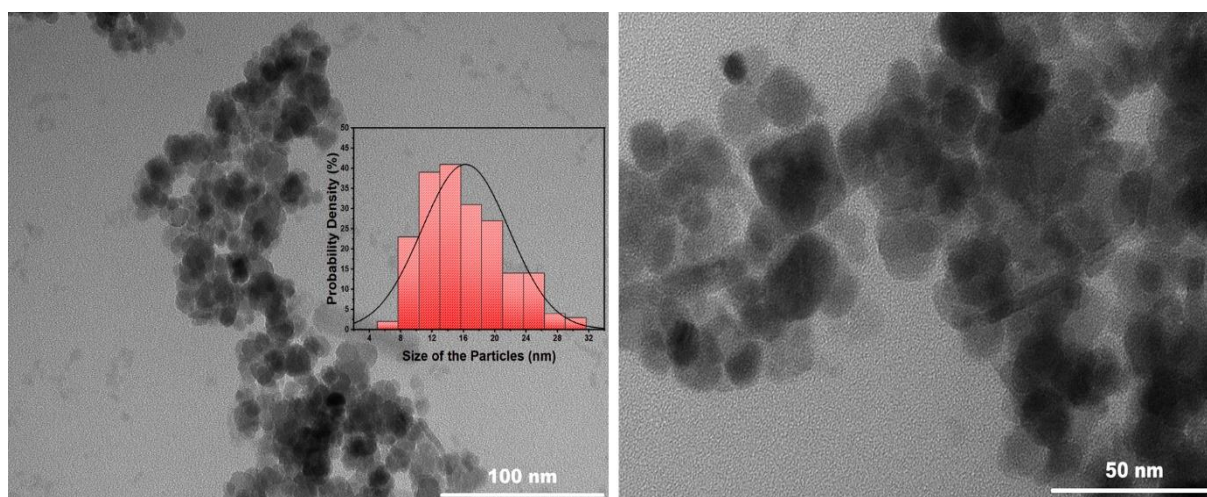
4.5.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A TEM foi utilizada para caracterizar a morfologia e o tamanho das nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$ (Figura 28). As micrografias revelaram nanopartículas com morfologia esférica, típica de magnetita sintetizada por co-precipitação em meio aquoso, na presença de hidróxido de amônio (NETO et al., 2021), com um diâmetro médio de $16,3 \pm 5,5$ nm. A estreita

distribuição de tamanho sugere um controle sobre os mecanismos de nucleação e crescimento durante a síntese, alinhando-se aos trabalhos já descritos na literatura (KOLEN'KO et al., 2014; LU et al., 2013).

Os resultados obtidos estão de acordo com a difração de Raios-X, em que foram obtidos tamanhos médios de cristalitos próximos de $18,7 \pm 0,6$ nm. Além disso, é interessante notar que a inserção de DTPMP no processo de síntese não altera a morfologia nem o tamanho médio das nanopartículas magnéticas obtidas, indicando que o revestimento não comprometeu a integridade estrutural do núcleo magnético.

Figura 28 – Micrografias de TEM do suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP}$. Detalhe: curva de distribuição de tamanho obtida a partir da análise TEM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

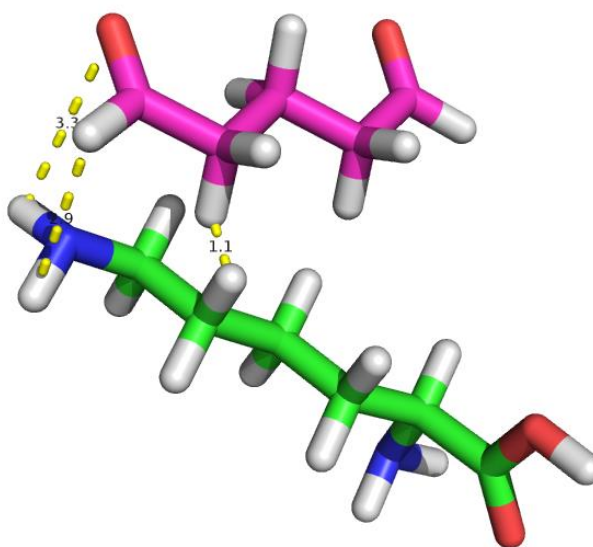
4.5.7 Simulação de Docking Molecular

Para avaliação *in silico* das bases moleculares que promovem a eficiência da ET2 ao interagir com o GLU, a simulação de docking molecular foi realizada e identificou o principal complexo formado: Lys-GLU (Figura 29). Primeiramente, foram analisadas as poses obtidas, que revelaram afinidade e especificidade do GLU à uma das extremidades da Lysine.

Neste sítio, a extremidade reativa da Lysine realiza duas ligações químicas relevantes (3,3 e 2,9 Å) com uma das extremidades do GLU, mas o complexo também é estabilizado por uma forte ligação de 1,1 Å de um hidrogênio da cadeia lateral da Lysine com outro hidrogênio

do centro da cadeia do GLU, e essas 3 ligações sugerem compatibilidade espacial e estrutural do GLU com a Lysine (resíduo-chave da ET2), corroborando os achados teóricos de Miranda et al. (2020).

Figura 29 – Complexo formado entre o resíduo-chave da lipase ET2, Lysine (cartoon verde), com o ligante GLU (stick rosa): interação promovida a partir de 3 ligações químicas (dots amarelos), que variam de 1,1 a 3,3 Å.

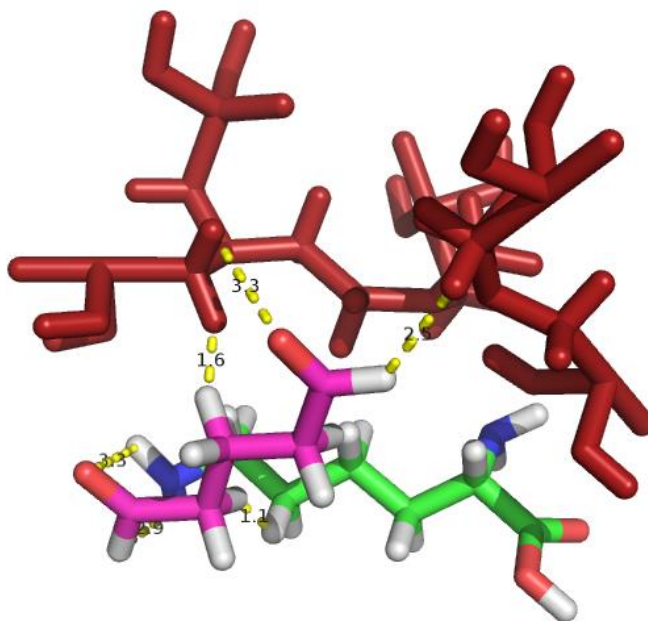


Fonte: Elaborado pelo autor.

A próxima etapa experimental *in silico* consistiu no estudo de docking molecular entre o DTPMP (receptor) e o complexo Lys-GLU (ligante), para elucidação das interações que sustentam a imobilização da lipase ET2 no suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ (Figura 30). O cluster mais estável (pose mais estável do ligante) indica que a associação do DTPMP ao complexo Lys-GLU se dá realmente através do GLU, em sua extremidade livre.

A formação do complexo principal foi promovida através de 3 ligações químicas, as duas principais sendo estabelecidas com a extremidade do GLU (3,3 e 2,5 Å) e a terceira com outro hidrogênio de um carbono do centro da cadeia (1,6 Å). A análise das evidências energéticas da complexação obtida nas duas experimentações *in silico* corroboram os dados experimentais que indicam a imobilização eficiente da ET2 ao suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ e são compatíveis com as ligações químicas elucidadas através do docking molecular. O complexo Lys-GLU teve energias de -6,0 a -3,6 kcal/mol entre os 10 clusters analisados e o complexo DTPMP-GLU-Lys apresentou valores entre -5,4 e -3,2 kcal/mol.

Figura 30 – Complexo DTPMP-GLU-Lys evidenciando a atuação do GLU como intermediário, se ligando ao DTPMP em uma extremidade e à Lysine em outra extremidade, conforme descrito anteriormente (MIRANDA et al., 2020): a interação da Lysine com o GLU é estabelecida através de 3 ligações químicas (1,1 a 3,3 Å) e a complexação do DTPMP através de 3 ligações químicas (3,3 a 1,6 Å).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados apresentados sugerem que o GLU estabelece afinidade e especificidade relevantes com o resíduo Lysine da lipase ET2, formando um complexo estável por meio de três ligações químicas (1,1 a 3,3 Å), em conformidade com achados teóricos prévios (MIRANDA et al., 2020). A interação subsequente do complexo Lys-GLU com o DTPMP confirmou o papel do GLU como intermediário, promovendo a ligação da Lysine em uma extremidade e a ancoragem ao DTPMP em outra, sustentada por três interações adicionais (1,6 a 3,3 Å). As análises energéticas reforçam essa compatibilidade estrutural, indicando valores entre -6,0 e -3,6 kcal/mol para o complexo Lys-GLU e entre -5,4 e -3,2 kcal/mol para o complexo DTPMP-GLU-Lys.

Em conjunto, os dados estruturais, espaciais e energéticos corroboram os resultados experimentais e demonstram que o GLU atua como elo funcional entre a lipase ET2 e o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, favorecendo a imobilização eficiente da enzima.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não foram encontrados outros estudos na literatura relatando a imobilização de ET2 em $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, o que pode abrir possibilidades para pesquisas futuras. Os resultados demonstraram que a carga enzimática, a força iônica e o tempo são parâmetros cruciais para a imobilização eficiente da enzima no suporte estudado. As condições ótimas identificadas foram: tempo de 6 horas, força iônica de 5 mM, carga enzimática de 5 mg/g de suporte e temperatura de 40°C.

Portanto, o planejamento Taguchi permitiu identificar condições ótimas em apenas 9 ensaios, em contraste com experimentos convencionais que exigiriam mais de 30 testes. A análise mostrou que a força iônica e a carga enzimática foram os fatores mais determinantes. Esse resultado confirma a eficiência do Taguchi em sistemas enzimáticos complexos, reforçando a aplicabilidade industrial de métodos de otimização estatística.

A utilização de GLU proporcionou vantagens significativas na imobilização da ET2, melhorando sua atividade e capacidade de reuso. A carga máxima enzimática obtida foi de aproximadamente 5 mg/g de suporte. A atividade da ET2 imobilizada nos solventes estudados não superou a atividade observada em tampão fosfato pH 7, sendo que a atividade máxima ocorreu em pH 9 e temperatura de 40°C.

Embora não tenha havido ganho de atividade em relação à enzima livre, a lipase imobilizada apresentou maior resiliência em faixas de pH (5–9) e temperaturas moderadas (30–50 °C). Essa estabilidade operacional garante robustez frente a variações de processo, diferencial essencial em contextos industriais, onde condições ideais raramente são mantidas.

As caracterizações estruturais e magnéticas forneceram evidências da formação adequada da ET2 imobilizada, bem como de seu tamanho, recobrimento e propriedades magnéticas em cada etapa do processo de síntese. O suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$ demonstrou ser uma plataforma eficiente para imobilização da ET2, conciliando rendimento adequado, alta preservação de atividade e robustez em diferentes condições.

O desempenho em reuso, a resposta positiva em solventes orgânicos e a estabilidade de armazenamento reforçam sua aplicabilidade em biocatálise sustentável. O docking molecular demonstrou que o GLU atua como elo funcional entre a ET2 e o suporte $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{DTPMP-GLU}$, favorecendo a imobilização eficiente da enzima.

Ao combinar simplicidade sintética com desempenho comparável a sistemas comerciais, este estudo oferece alternativa competitiva para produção de biocombustíveis e síntese verde. Portanto, o novo suporte oferece desempenho competitivo e complementar.

REFERÊNCIAS

- ABDELLA, M. A. A.; HASSAN, M. E. Covalent immobilization of β -galactosidase using a novel carrier alginate/tea waste: statistical optimization of beads modification and reusability. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 47, n. 2, p. 249–261, 1 Feb. 2024.
- ABDELLA, M. A. A.; HASSAN, M. E.; SOLIMAN, T. N. Covalently immobilized β -galactosidase onto a novel alginate/lemon peel carrier: Catalytic, kinetic, stability studies, and its application in the production of whey high-protein beverage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 307, p. 142222, 1 May 2025.
- AFAQ, M. et al. Sonochemical synthesis of CoO-ZnO nanocomposite and optimizing the degradation of toxic anionic dye using RSM-BBD. **Materials Science and Engineering: B**, v. 312, p. 117847, 1 Feb. 2025.
- AGGARWAL, S.; IKRAM, S. Aluminum Oxide Nanoparticles-Impregnated Aminated Silica Surfaces for Covalent Immobilization of Urease via Glutaraldehyde Activation: Stability and Kinetic Studies. **ChemistrySelect**, v. 10, n. 15, p. e202405033, 1 Apr. 2025.
- AGHABEIGI, F. et al. Immobilization of lipase on the graphene oxides magnetized with NiFe₂O₄ nanoparticles for biodiesel production from microalgae lipids. **Process Biochemistry**, v. 126, p. 171–185, 1 Mar. 2023.
- AKRAM, F. et al. Abridgement of Microbial Esterases and Their Eminent Industrial Endeavors. **Molecular Biotechnology**, v. 67, n. 3, p. 817–833, 9 Mar. 2025.
- AL-MAQDI, K. A. et al. Challenges and recent advances in enzyme-mediated wastewater remediation—a review. **Nanomaterials**, v. 11, n. 11, p. 3124, 19 Nov. 2021.
- ALEXANDRE, J. Y. N. H. et al. A Theoretical and Experimental Study for Enzymatic Biodiesel Production from Babassu Oil (*Orbignya* sp.) Using Eversa Lipase. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1322, 27 Oct. 2022.
- ALI, M. et al. Immobilization of peroxidase on polypyrrole-cellulose-graphene oxide nanocomposite via non-covalent interactions for the degradation of Reactive Blue 4 dye. **Chemosphere**, v. 202, p. 198–207, 1 Jul. 2018.
- ALI, S. et al. The Recent Advances in the Utility of Microbial Lipases: A Review. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 510, 17 Feb. 2023.
- ALPTEKİN, Ö. Characteristics of immobilized urease onto modified zirconium (IV) oxide via glutaraldehyde: kinetic, stability, and operational stabilities in bioreactors. **Chemical Papers**, v. 76, n. 2, p. 749–761, 1 Feb. 2022.
- ALPTEKİN, Ö. Üreazın modifiye edilmiş florisile kovalent immobilizasyonu ve serbest ve immobilize üreazın karakterizasyonu. **Cukurova Medical Journal**, v. 44, n. 3, p. 811–818, 30 Sep. 2019.
- ALZHRANI, F. et al. The Use of Immobilised Enzymes for Lipid and Dairy Processing and

Their Waste Products: A Review of Current Progress. **Processes**, v. 12, n. 4, p. 634, 22 Mar. 2024.

AMERI, A. et al. Immobilization of Thermoalkalophilic Lipase from *Bacillus atrophaeus* FSHM2 on Amine-Modified Graphene Oxide Nanostructures: Statistical Optimization and Its Application for Pentyl Valerate Synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 191, n. 2, p. 579–604, 1 Jun. 2020.

AMIN, F. et al. Immobilization, biochemical, thermodynamic, and fruit juice clarification properties of lignocellulosic biomass-derived exo-polygalacturonase from *Penicillium paxilli*. **Biomass Conversion and Biorefinery**, v. 13, n. 14, p. 13181–13196, 1 Sep. 2023.

AMOUPOUR, M. et al. Suppression of SOCS3 expression in macrophage cells: Potential application in diabetic wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 262, p. 129876, 1 Mar. 2024.

ANGEWANDTE CHEMIE INTERNATIONAL EDITION. **Aims and Scope**. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/15213773/homepage/productinformation.html>. Acesso em: 24 ago. 2025.

ARANA-PEÑA, S. et al. Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 513297, 28 Feb. 2020.

ARANA-PEÑA, S. et al. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**, v. 362, p. 130–140, 15 Feb. 2021.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of eversa lipase on octyl agarose beads and preliminary characterization of stability and activity features. **Catalysts**, v. 8, n. 11, p. 511, 2 Nov. 2018.

ARIA, M.; CUCCURULLO, C. bibliometrix: An R-tool for comprehensive science mapping analysis. **Journal of Informetrics**, v. 11, n. 4, p. 959–975, 1 Nov. 2017.

ARORA, K.; LEDWANI, L.; KOMAL. A Comprehensive Review on the Synthesis and Therapeutic Potential of Cobalt Ferrite (CoFe₂O₄) Nanoparticles. **ChemistrySelect**, v. 10, n. 1, p. e202404136, 1 Jan. 2025.

ASADUZZAMAN, F.; SALMON, S. Enzyme immobilization: polymer-solvent-enzyme compatibility. **Molecular Systems Design and Engineering**, v. 7, n. 11, p. 1385–1414, 31 Oct. 2022.

ASMAT, S.; HUSAIN, Q.; AZAM, A. Lipase immobilization on facile synthesized polyaniline-coated silver-functionalized graphene oxide nanocomposites as novel biocatalysts: Stability and activity insights. **RSC Advances**, v. 7, n. 9, p. 5019–5029, 17 Jan. 2017.

ATIROĞLU, V. et al. Green immobilization: Enhancing enzyme stability and reusability on eco-friendly support. **Food Chemistry**, v. 448, p. 138978, 1 Aug. 2024.

ATİROĞLU, V. Lipase immobilization on synthesized hyaluronic acid-coated magnetic nanoparticle-functionalized graphene oxide composites as new biocatalysts: Improved reusability, stability, and activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 145, p. 456–465, 15 Feb. 2020.

BABAKI, M. et al. Effect of water, organic solvent and adsorbent contents on production of biodiesel fuel from canola oil catalyzed by various lipases immobilized on epoxy-functionalized silica as low cost biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 93–99, 1 Oct. 2015.

BADGUJAR, K. C.; BADGUJAR, V. C.; BHANAGE, B. M. Recent update on use of ionic liquids for enzyme immobilization, activation, and catalysis: A partnership for sustainability. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 36, p. 100621, 1 Aug. 2022.

BAI, H.; YU, D.; DU, X. Review of porous microspheres for enzyme immobilization: Strategies, applications, and prospects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 295, p. 139627, 1 Mar. 2025.

BARATI, F. et al. In silico approaches to investigate enzyme immobilization: a comprehensive systematic review. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 26, n. 7, p. 5744–5761, 14 Feb. 2024.

BARBOSA, O. et al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220–1227, 1 Aug. 2012.

BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, n. 4, p. 1583–1600, 2 Dec. 2014.

BENÍTEZ-MATEOS, A. I. et al. Dual Valorization of Lignin as a Versatile and Renewable Matrix for Enzyme Immobilization and (Flow) Bioprocess Engineering. **ChemSusChem**, v. 14, n. 15, p. 3198–3207, 9 Aug. 2021.

BENIWAL, N. et al. Rapid sonochemical synthesis of highly active and stable 2-D inorganic-organic hybrid catalyst for solvent-free CO₂ cycloaddition with epoxides. **Journal of Molecular Structure**, v. 1320, p. 139502, 15 Jan. 2025.

BEZERRA, R. M. et al. A new heterofunctional support for enzyme immobilization: PEI functionalized Fe₃O₄ MNPs activated with divinyl sulfone. Application in the immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 138, p. 109560, 1 Aug. 2020.

BIÉ, J. et al. Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications. **Processes**, v. 10, n. 3, p. 494, 1 Mar. 2022.

BILAL, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530–2544, 1 Dec. 2018.

BILAL, M. et al. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, 17 Feb. 2019a.

BILAL, M. et al. Multifunctional metal-organic frameworks-based biocatalytic platforms: Recent developments and future prospects. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 8, n. 2, p. 2359–2371, 1 Apr. 2019b.

BILAL, M. et al. Multi-enzyme co-immobilized nano-assemblies: Bringing enzymes together for expanding bio-catalysis scope to meet biotechnological challenges. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 186, p. 735–749, 1 Sep. 2021.

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

BOLIVAR, J. M.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, n. 15, p. 6251–6290, 1 Aug. 2022.

BOUZID, M.; DJADI, A. Nanostructured Calcium Phosphate Dihydrate- Glutaraldehyde Complex as an Innovative Biocidal Film for Anti Sars-Cov-2 Protection of Inanimate Surfaces, Air and a Water Sanitization. **Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology**, v. 9, n. 3, p. 1–5, 2021.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 May 1976.

BRAHAM, S. A. et al. Effect of Tris Buffer in the Intensity of the Multipoint Covalent Immobilization of Enzymes in Glyoxyl-Agarose Beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 9, p. 2843–2857, 1 Sep. 2021.

BRANDÃO JÚNIOR, J. et al. Performance of Eversa Transform 2.0 Lipase in Ester Production Using Babassu Oil (*Orbignya* sp.) and Tucuman Oil (*Astrocaryum vulgare*): A Comparative Study between Liquid and Immobilized Forms in Fe₃O₄ Nanoparticles. **Catalysts**, v. 13, n. 3, p. 571, 11 Mar. 2023.

BULLO, G. T. et al. Lipases: market study and potential applications of immobilized derivatives. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 18, n. 5, p. 1676–1689, 1 Sep. 2024.

CALIFANO, D. et al. Diaminated Cellulose Beads as a Sustainable Support for Industrially Relevant Lipases. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 12, n. 20, p. 7703–7712, 20 May 2024.

CARBALLARES, D. et al. Reutilization of the Most Stable Coimmobilized Enzyme Using Glutaraldehyde Chemistry to Produce a New Combi-biocatalyst When the Coimmobilized Enzyme with a Lower Stability Is Inactivated. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 12, n. 17, p. 6564–6572, 29 Apr. 2024.

- CARDOSO, C. L.; DE MORAES, M. C.; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: Uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 175–187, 2009.
- CARRARO, F. et al. Magnetically Responsive Enzyme and Hydrogen-Bonded Organic Framework Biocomposites for Biosensing. **Small**, v. 20, n. 52, p. 2407487, 1 Dec. 2024.
- CAVALCANTE, A. L. G. et al. Chemical modification of clay nanocomposites for the improvement of the catalytic properties of Lipase A from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 120, p. 1–14, 1 Sep. 2022.
- CAVALCANTE, A. L. G. et al. Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: toward sustainable industrial applications. **RSC Advances**, v. 14, n. 25, p. 17946–17988, 5 Jun. 2024.
- CAVALCANTE, F. T. T. et al. Current status and future perspectives of supports and protocols for enzyme immobilization. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1222, 11 Oct. 2021.
- CHAI, M. et al. Application of Machine Learning Algorithms to Estimate Enzyme Loading, Immobilization Yield, Activity Retention, and Reusability of Enzyme-Metal-Organic Framework Biocatalysts. **Chemistry of Materials**, v. 33, n. 22, p. 8666–8676, 23 Nov. 2021.
- CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 491–499, 15 Jan. 2013.
- CHALELLA MAZZOCATO, M.; JACQUIER, J. C. Recent Advances and Perspectives on Food-Grade Immobilisation Systems for Enzymes. **Foods**, v. 13, n. 13, p. 2127, 3 Jul. 2024.
- CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 5 Jun. 2018.
- CHEN, S.; ZHANG, Y.; LI, L. A Comparative Study of Credit Risk Infection at Domestic and Abroad Based on Knowledge Map. **Procedia Computer Science**, v. 199, p. 215–222, 2022.
- CHEN, T. et al. Biodegradable films of chitosan and tea polyphenols catalyzed by laccase and their physical and antioxidant activities. **Food Bioscience**, v. 46, p. 101513, 1 Apr. 2022.
- CHENG, P. et al. Knowledge mapping of research on land use change and food security: A visual analysis using citespace and vosviewer. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 24, p. 13065, 10 Dec. 2021.
- CHENG, Y. C. et al. Towards sustainable management of polyacrylamide in soil-water environment: Occurrence, degradation, and risk. **Science of The Total Environment**, v. 926, p. 171587, 20 May 2024.
- CHERNI, O. et al. Tuning almond lipase features by the buffer used during immobilization: The apparent biocatalysts stability depends on the immobilization and inactivation buffers and the substrate utilized. **Journal of Biotechnology**, v. 391, p. 72–80, 10 Aug. 2024.

CIPOLATTI, E. P. et al. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 1 Jan. 2014.

CIPOLATTI, E. P. et al. Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. **RSC Advances**, v. 6, n. 106, p. 104675–104692, 2 Nov. 2016.

DAHIYA, M. et al. Detoxification and decolorization of complex textile effluent in an enzyme membrane reactor: batch and continuous studies. **Frontiers in Microbiology**, v. 14, p. 1193875, 7 Jul. 2023.

DANIEL, M. et al. MOF based electrochemical sensors for the detection of physiologically relevant biomolecules: An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 468, p. 214627, 1 Oct. 2022.

DE MORAES, L. L.; KAFURE, I. Bibliometrics and data Science: An example search and analysis of scientific information from the Web of Science (WoS). **Revista Digital de Biblioteconomia e Ciencia da Informacao**, v. 18, p. e020016, 2020.

DEHSARI, H. S. et al. Determining Magnetite/Maghemite Composition and Core-Shell Nanostructure from Magnetization Curve for Iron Oxide Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 122, n. 49, p. 28292–28301, 13 Dec. 2018.

DELANO, W. **The PyMOL Molecular Graphics System**. 1.7.4 Schrödinger, LLC, , 2015.

DENG, J. et al. Catalyzed degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by recoverable magnetic chitosan immobilized laccase from *Trametes versicolor*. **Chemosphere**, v. 301, p. 134753, 1 Aug. 2022.

DHAWANE, S. H.; CHOWDHURY, S.; HALDER, G. Lipase immobilised carbonaceous catalyst assisted enzymatic transesterification of Mesua ferrea oil. **Energy Conversion and Management**, v. 184, p. 671–680, 15 Mar. 2019.

DICHIARANTE, V.; MILANI, R.; METRANGOLO, P. Natural surfactants towards a more sustainable fluorine chemistry. **Green Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 13–27, 2018.

DING, J.; QIN, W. Recent advances in potentiometric biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry Elsevier**, v. 124, p. 1–12, 1 Mar. 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993619306466?casa_token=F6Z-_1cK6cUAAAAA:qpxhjPZF4UkC7Q9uSmX5zwOBSgxu9ielQjKRceYwNAXHOkYobW9RggobWUeMbJ1DQtJlxgQRGA. Acesso em: 15 ago. 2025

DOUKYU, N.; OGINO, H. Organic solvent-tolerant enzymes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 48, n. 3, p. 270–282, 15 Feb. 2010.

FAHIM, Y. A. et al. Biomedical and environmental applications via nanobiocatalysts and enzyme immobilization. **European Journal of Medical Research**, v. 30, n. 1, p. 1–17, 21 Jun. 2025.

FANG, Y. F. et al. Polymer materials for enzyme immobilization and their application in bioreactors. **BMB Reports**, v. 44, n. 2, p. 87–95, Feb. 2011.

- FARRIS, S.; SONG, J.; HUANG, Q. Alternative reaction mechanism for the cross-linking of gelatin with glutaraldehyde. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 2, p. 998–1003, 27 Jan. 2010.
- FEDERSEL, H.-J. et al. Recent Trends in Enzyme Immobilization—Concepts for Expanding the Biocatalysis Toolbox. **Molecules** **2021**, Vol. 26, Page 2822, v. 26, n. 9, p. 2822, 10 May 2021.
- FENG, J. et al. Review of covalent organic frameworks for enzyme immobilization: Strategies, applications, and prospects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 248, p. 125729, 1 Sep. 2023.
- FENG, Y. et al. Recent advances in enzyme immobilization based on novel porous framework materials and its applications in biosensing. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 459, p. 214414, 15 May 2022.
- FERREIRA MOTA, G. et al. Biodiesel production from microalgae using lipase-based catalysts: Current challenges and prospects. **Algal Research**, v. 62, p. 102616, 1 Mar. 2022.
- FORTES, C. C. S. et al. Optimization of enzyme immobilization on functionalized magnetic nanoparticles for laccase biocatalytic reactions. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 117, p. 1–8, 1 Jul. 2017.
- FURLANI, I. L. et al. Imobilização enzimática: conceito e efeitos na proteólise. **Quim. Nova**, v. 43, n. 4, p. 463–473, 2020.
- GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 1 Nov. 2011.
- GESTRELIUS, S. Immobilized Penicillin Acylase for Production of 6-Apa From Penicillin-V. In: WEETALL, H. H.; ROYER, G. P. **Enzyme Engineering**. Boston, MA: Springer, 1980, v. 5, p. 439–442.
- GKANIATSOU, E. et al. Enzyme Encapsulation in Mesoporous Metal–Organic Frameworks for Selective Biodegradation of Harmful Dye Molecules. **Angewandte Chemie**, v. 130, n. 49, p. 16373–16378, 3 Dec. 2018.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Industrial Enzymes Market (2025-2033)**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/industrial-enzymes-market>. Acesso em: 20 ago. 2025.
- GREIFENSTEIN, R. et al. MOF-Hosted Enzymes for Continuous Flow Catalysis in Aqueous and Organic Solvents. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 61, n. 18, p. e202117144, 25 Apr. 2022.
- GUAJARDO, N. Immobilization of Lipases Using Poly(vinyl) Alcohol. **Polymers**, v. 15, n. 9, p. 2021, 24 Apr. 2023.

GUAJARDO, N.; AHUMADA, K.; DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. Immobilized lipase-CLEA aggregates encapsulated in lentikats® as robust biocatalysts for continuous processes in deep eutectic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 310, p. 97–102, 20 Feb. 2020.

GUISAN, J. M. et al. Enzyme immobilization strategies for the design of robust and efficient biocatalysts. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 35, p. 100593, 1 Jun. 2022.

GUZMAN, M. L. et al. Enzymatic activity in the presence of surfactants commonly used in dissolution media, Part 1: Pepsin. **Results in Pharma Sciences**, v. 6, p. 15–19, 1 Jan. 2016.

HACKENHAAR, C. R. et al. Development of a biocomposite based on alginate/gelatin crosslinked with genipin for β -galactosidase immobilization: Performance and characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 291, p. 119483, 1 Sep. 2022.

HADADI, M.; HABIBI, A. Improved activity and stability of cellulase by immobilization on Fe₃O₄ nanoparticles functionalized with Reactive Red 120. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 295, p. 139624, 1 Mar. 2025.

HAN, J. et al. Immobilization of cellulase on thermo-sensitive magnetic microspheres: improved stability and reproducibility. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 7, p. 1051–1060, 1 Jul. 2018.

HANGXUN, X.; ZEIGER, B. W.; SUSLICK, K. S. Sonochemical synthesis of nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 7, p. 2555–2567, 11 Mar. 2013.

HARANAL, S.; RANGANATH, V. AMBEKAR; MAITY, I. Urease-coupled systems and materials: design strategies, scope and applications. **Journal of Materials Chemistry B Royal Society of Chemistry**, 2 Apr. 2025. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2025/tb/d4tb02853h>. Acesso em: 15 ago. 2025

HASSAN, M. E.; IBRAHIM, G. E.; ABDELLA, M. A. A. Enhancement of β -galactosidase catalytic activity and stability through covalent immobilization onto alginate/tea waste beads and evaluating its impact on the quality of some dairy products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 278, p. 134810, 1 Oct. 2024.

HONG, J. et al. Immobilization of laccase via cross-linked enzyme aggregates prepared using genipin as a natural cross-linker. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 169, p. 541–550, 1 Feb. 2021.

HSU, C.-Y. et al. Recent advances in nanozymes based on mesoporous materials for enhancing the performance of colorimetric biosensors: Applications and challenges. **Nanoscale**, v. 17, n. 31, p. 17980–17992, 7 Aug. 2025.

HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 45, p. 8582–8594, 27 Oct. 2008.

HUSSAIN, A. et al. Urease-Based Biocatalytic Platforms—A Modern View of a Classic Enzyme with Applied Perspectives. **Catalysis Letters**, v. 152, n. 2, p. 414–437, 8 May 2022.

IMAM, H. T.; MARR, P. C.; MARR, A. C. Enzyme entrapment, biocatalyst immobilization without covalent attachment. **Green Chemistry**, v. 23, n. 14, p. 4980–5005, 21 Jul. 2021.

INTISAR, A. et al. Enzyme immobilization on nanomaterials and nanostructured supports. In: FERREIRA, Maria Luján (ed.). **Biocatalyst Immobilization: Foundations and Applications**. 1. ed. [s.l.] Academic Press, 2022. p. 231–247.

IYENGAR, S. J. et al. Magnetic, X-ray and Mössbauer studies on magnetite/maghemite core-shell nanostructures fabricated through an aqueous route. **RSC Advances**, v. 4, n. 110, p. 64919–64929, 2014.

Jl, Y. et al. Enzyme-functionalized magnetic framework composite fabricated by one-pot encapsulation of lipase and Fe₃O₄ nanoparticle into metal–organic framework. **Biochemical Engineering Journal**, v. 169, p. 107962, 1 May 2021.

JOHN, A. J.; SELVARAJAN, E. Ionic liquid-assisted pretreatment of lignocellulosic biomass using purified *Streptomyces* MS2A cellulase for bioethanol production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 270, p. 132149, 1 Jun. 2024.

JONOVIC, M. et al. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Magnetite-Alginate Beads to Enable Effective Strong Binding and Enzyme Recycling during Anthraquinone Dyes' Degradation. **Polymers**, v. 14, n. 13, p. 2614, 1 Jul. 2022.

KARIM, A. et al. Thermodynamics, kinetics and optimization of catalytic behavior of polyacrylamide-entrapped carboxymethyl cellulase (CMCase) for prospective industrial use. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 11, p. 2417–2427, 1 Nov. 2021.

KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. MAR, p. 247303, 9 Mar. 2017.

KHAN, M. R. Immobilized enzymes: a comprehensive review. **Bulletin of the National Research Centre 2021**, v. 45, n. 1, p. 1–13, 4 Dec. 2021.

KHANRA, M.; RAVICHANDIRAN, V.; SWAIN, S. P. Lipase Enzymes for Sustainable Synthesis of Pharmaceuticals and Chiral Organic Building Blocks. **Advanced Sustainable Systems**, v. 9, n. 1, p. 2400495, 1 Jan. 2024.

KHATAMI, S. H. et al. Glucose oxidase: Applications, sources, and recombinant production. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 69, n. 3, p. 939–950, 1 Jun. 2022.

KHOobi, M. et al. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. **Materials Chemistry and Physics**, v. 149, p. 77–86, 2015.

KHORAMIAN, R. et al. Surface modification of nanoparticles for enhanced applicability of nanofluids in harsh reservoir conditions: A comprehensive review for improved oil recovery. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 333, p. 103296, 1 Nov. 2024.

KIKANI, B. et al. Solvent tolerant enzymes in extremophiles: Adaptations and applications.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 238, p. 124051, 31 May 2023.

KILDEEVA, N. R. et al. About mechanism of chitosan cross-linking with glutaraldehyde. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 360–369, May 2009.

KLAPISZEWSKI, Ł.; ZDARTA, J.; JESIONOWSKI, T. Titania/lignin hybrid materials as a novel support for α -amylase immobilization: A comprehensive study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p. 90–97, 1 Feb. 2018.

KOLEN'KO, Y. V. et al. Large-scale synthesis of colloidal Fe₃O₄ nanoparticles exhibiting high heating efficiency in magnetic hyperthermia. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 16, p. 8691–8701, 24 Apr. 2014.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; NGHIEM, L. D.; JESIONOWSKI, T. Functionalized Materials as a Versatile Platform for Enzyme Immobilization in Wastewater Treatment. **Current Pollution Reports**, v. 7, n. 3, p. 263–276, 1 Sep. 2021.

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; ZDARTA, J.; JESIONOWSKI, T. Physicochemical and catalytic properties of acylase I from *aspergillus melleus* immobilized on amino- and carbonyl-grafted stöber silica. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 3, p. 767–777, 1 May 2018.

KONG, D. et al. A combined immobilization system for high-solids cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. **Renewable Energy**, v. 241, p. 122304, 1 Mar. 2025.

KOTWAL, N. et al. Enzyme immobilization with nanomaterials for hydrolysis of lignocellulosic biomass: Challenges and future Perspectives. **Carbohydrate Research**, v. 543, n. 20, p. 7703–7712, 20 May 2024.

KOWALCZYKIEWICZ, D. et al. Rotating bed reactor packed with heterofunctional structured silica-supported lipase. Developing an effective system for the organic solvent and aqueous phase reactions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 312, p. 110789, 1 Jan. 2021.

KUJAWA, J. et al. Bioconjugation Strategy for Ceramic Membranes Decorated with Candida Antarctica Lipase B—Impact of Immobilization Process on Material Features. **Materials**, v. 15, n. 2, p. 671, 1 Jan. 2022.

LALAOUI, N. et al. Direct Electron Transfer between a Site-Specific Pyrene-Modified Laccase and Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Supramolecular Assemblies for Bioelectrocatalytic Dioxygen Reduction. **ACS Catalysis**, v. 6, n. 3, p. 1894–1900, 4 Mar. 2016.

LESUEUR, C.; PFEFFER, M.; FUERHACKER, M. Photodegradation of phosphonates in water. **Chemosphere**, v. 59, n. 5, p. 685–691, 1 Apr. 2005.

LI, D.; WEI, Z.; XUE, C. Alginate-based delivery systems for food bioactive ingredients: An overview of recent advances and future trends. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 20, n. 6, p. 5345–5369, 1 Nov. 2021.

LI, S. et al. Process optimization of polyphenol oxidase immobilization: Isotherm, kinetic, thermodynamic and removal of phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 792–803, 31 Aug. 2021.

LI, S. et al. Evolved enzymes in the metabolism of biological poly-acids: Applications in otolaryngological biocatalysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 302, p. 140068, 1 Apr. 2025.

LIANG, W. et al. Machine Learning Optimizing Enzyme/ZIF Biocomposites for Enhanced Encapsulation Efficiency and Bioactivity. **JACS Au**, v. 4, n. 8, p. 3170–3182, 26 Aug. 2024.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6236–6249, 8 Jul. 2013.

LIMA, C. A. et al. Trends in Enzyme Production from Citrus By-Products. **Processes**, v. 13, n. 3, p. 766, 6 Mar. 2025.

LIMA, J. DE S. DE et al. Functionalized kaolin as support for endoglucanase immobilization. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 7, p. 1165–1173, 12 Jul. 2019.

LIMA, J. DE S. DE et al. Immobilization of endoglucanase on kaolin by adsorption and covalent bonding. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 44, n. 8, p. 1627–1637, 1 Aug. 2021.

LIMA NETO, J. G. et al. Enzymatic Hydroesterification of Waste Oils: Combilipase-Assisted Ethyl Ester Synthesis via a Dual-Step Biocatalytic Process. **ACS Omega**, v. 10, n. 20, p. 20623–20637, 27 May 2025.

LIOW, M. Y. et al. Enhancing efficiency of ultrasound-assisted biodiesel production catalyzed by Eversa® Transform 2.0 at low lipase concentration: Enzyme characterization and process optimization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 271, p. 132538, 1 Jun. 2024.

LIU, S. et al. Smart chemistry of enzyme immobilization using various support matrices – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 190, p. 396–408, 1 Nov. 2021.

LIU, Y.; HUANG, A.; WEN, X. Enhanced stability and catalytic performance of immobilized phospholipase D on chitosan-encapsulated magnetic nanoparticles using oxidized dextran and glutaraldehyde as cross-linkers. **Biochemical Engineering Journal**, v. 212, p. 109499, 1 Dec. 2024.

LOKHA, Y. et al. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, p. 109461, 1 Feb. 2020.

LONAPPAN, L. et al. Covalent immobilization of laccase on citric acid functionalized micro-biochars derived from different feedstock and removal of diclofenac. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, p. 985–994, 1 Nov. 2018a.

LONAPPAN, L. et al. Adsorptive immobilization of agro-industrially produced crude laccase on various micro-biochars and degradation of diclofenac. **Science of the Total Environment**, v. 640–641, p. 1251–1258, 1 Nov. 2018b.

LOPEZ-BARBOSA, N. et al. Congo red decolorization using textile filters and laccase-based nanocomposites in continuous flow bioreactors. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1–17, 24 Jun. 2020.

LU, J. et al. SiO₂-Coated Fe₃O₄Nanoparticle/Polyacrylonitrile Beads for One-Step Lipase Immobilization. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 8, p. 7856–7869, 27 Aug. 2021.

LU, J. et al. Fe₃O₄ Nanoparticle-Polyacrylonitrile Composite Magnetic Beads Decorated with *Candida antarctica* Lipase B for Long-Term Reusability in the Hydrolysis of Esters. **ACS Applied Nano Materials**, v. 6, n. 20, p. 19392–19402, 27 Oct. 2023.

LU, T. et al. Surfactant effects on the microstructures of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by microemulsion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 436, p. 675–683, 2013.

LV, L. et al. Progress in enzymatic biodiesel production and commercialization. **Processes**, v. 9, n. 2, p. 1–10, 15 Feb. 2021.

MA, X. et al. Silica Capsules Templated from Metal-Organic Frameworks for Enzyme Immobilization and Catalysis. **Langmuir**, v. 37, n. 10, p. 3166–3172, 16 Mar. 2021.

MAGHRABY, Y. R. et al. Enzyme Immobilization Technologies and Industrial Applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184–5196, 14 Feb. 2023.

MACHADO, Daniel Alves (org.). **Dhammapada**. Trad. Natã Oliveira. Brasília: Editora Kiron, 2011. 88 p.

MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213–6222, 8 Jul. 2013.

MANDAL, B. et al. Multipoint Immobilization at the Inert Center of Urease on Homofunctional Diazo-Activated Silica Gel: A Way of Restoring Room-Temperature Catalytic Sustainability for Perennial Utilization. **Langmuir**, v. 38, n. 22, p. 6826–6840, 7 Jun. 2022.

MANOJ, G. M. et al. Recent advancements in the surface modification and functionalization of magnetic nanomaterials. **Applied Surface Science Advances**, v. 21, p. 100608, 1 Jun. 2024.

MAO, D. et al. Rolling-circle-amplification-based DNA-enzyme nanostructure for immobilization and functionalization of enzymes. **Chem**, v. 11, n. 2, 13 Feb. 2025.

MARQUES, P. R. B. D. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.

MATEO, C. et al. Multifunctional epoxy supports: A new tool to improve the covalent

immobilization of proteins. The promotion of physical adsorptions of proteins on the supports before their covalent linkage. **Biomacromolecules**, v. 1, n. 4, p. 739–745, 2000.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2 May 2007.

MATEO, C. et al. Multi-Point Covalent Immobilization of Enzymes on Supports Activated with Epoxy Groups: Stabilization of Industrial Enzymes. **Methods in Molecular Biology**, v. 2100, p. 109–117, 2020.

MDPI. **Molecules - An Open Access Journal from MDPI**. Disponível em: <https://br.search.yahoo.com/search?fr=mcafee&type=E210BR91213G0&p=MOLECULES+journal>. Acesso em: 24 ago. 2025.

MEENA, J. et al. Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 338, p. 116602, 15 Sep. 2021.

MELO, A. D. Q. et al. Synthesis of benzyl acetate catalyzed by lipase immobilized in nontoxic chitosan-polyphosphate beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2165, 7 Dec. 2017.

MELO, R. L. F. et al. Enhancing biocatalyst performance through immobilization of lipase (Eversa® Transform 2.0) on hybrid amine-epoxy core-shell magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 264, p. 130730, 1 Apr. 2024.

MEYER, J. et al. Functionalized poly(aspartic acid) hydrogel particles as carriers for covalent enzyme immobilization. **RSC Sustainability**, v. 3, n. 8, p. 3554–3566, 30 Jul. 2025.

MILOVANOVIĆ, J. et al. The Organic-Functionalized Silica Nanoparticles as Lipase Carriers for Biocatalytic Application: Future Perspective in Biodegradation. **Catalysts** **2025**, Vol. 15, Page 54, v. 15, n. 1, p. 54, 9 Jan. 2025.

MIN, K.; YOO, Y. J. Recent progress in nanobiocatalysis for enzyme immobilization and its application. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 19, n. 4, p. 553–567, 1 Jul. 2014.

MIRANDA, L. P. et al. Composites of crosslinked aggregates of everesa® transform and magnetic nanoparticles. Performance in the ethanolysis of soybean oil. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 817, 22 Jul. 2020.

MIRSALAMI, S. M.; MIRSALAMI, M.; GHODOUSIAN, A. Techniques for immobilizing enzymes to create durable and effective biocatalysts. **Results in Chemistry**, v. 7, p. 101486, 1 Jan. 2024.

MOHAMMED, B.; AMINA, D.; BOUDJEMAA, B. Complex di-hydrate calcium phosphate-glutaraldehyde: formulation mechanism. **European Scientific Journal**, ESJ, v. 11, n. 10, 13 Nov. 2015.

MOHD HUSSIN, F. N. N.; ATTAN, N.; WAHAB, R. A. Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary

alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 136, p. 109506, 1 May 2020.

MONSAN, P. Optimization of glutaraldehyde activation of a support for enzyme immobilization. **Journal of Molecular Catalysis**, v. 3, n. 5, p. 371–384, 1 Feb. 1978.

MONTEIRO, L. M. O. et al. Efficient hydrolysis of wine and grape juice anthocyanins by *Malbranchea pulchella* β -glucosidase immobilized on MANAE-agarose and ConA-Sepharose supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 1133–1141, 1 Sep. 2019a.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of lipase a from *Candida antarctica* onto Chitosan-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 17 Aug. 2019b.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipases a and b from *Candida antarctica* immobilized onto magnetic nanoparticles. Improvement of biocatalysts' performance under ultrasonic irradiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 22, p. 5807, 19 Nov. 2019c.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Enzyme-coated micro-crystals: An almost forgotten but very simple and elegant immobilization strategy. **Catalysts**, v. 10, n. 8, p. 1–27, 6 Aug. 2020.

MONTES, T. et al. Genetic modification of the penicillin G acylase surface to improve its reversible immobilization on ionic exchangers. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 1, p. 312–319, Jan. 2007.

MOORTHY, M. S.; NAGAPPAN, S.; HA, C. S. Mesoporous Silica and Organosilica Biosensors for Water Quality and Environmental Monitoring. In: TRECCANI, L.; MEDER, F. (ed.). **Surface-Functionalized Ceramics: For Biotechnological and Environmental Applications**. 1. ed. [s.l.] Wiley, 2022. p. 369–406.

MOREIRA, K. DA S. et al. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 544875, 30 Jun. 2020a.

MOREIRA, K. DA S. et al. Taguchi design-assisted co-immobilization of lipase A and B from *Candida antarctica* onto chitosan: Characterization, kinetic resolution application, and docking studies. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 177, p. 223–244, 1 Jan. 2022.

MOREIRA, K. S. et al. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya* sp.) via RSM. **Catalysts**, v. 10, n. 4, p. 414, 9 Apr. 2020b.

MOTAMEDI, E. et al. Upgrading the enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass by immobilization of metagenome-derived novel halotolerant cellulase on the carboxymethyl cellulose-based hydrogel. **Cellulose**, v. 28, n. 6, p. 3485–3503, 1 Apr. 2021.

MOU, Z. et al. Machine learning-based prediction of enzyme substrate scope: Application to

bacterial nitrilases. **Proteins**, v. 89, n. 3, p. 336–347, 1 Mar. 2021.

MOYA JOËLLE CAROLE, A. et al. Transesterification of vegetable oils into biodiesel by an immobilized lipase: a review. **Biofuels**, v. 14, n. 10, p. 1087–1101, 26 Nov. 2023.

MUKHEJA, Y. et al. Lignin: The green powerhouse for enzyme immobilization in biocatalysis and biosensing. **International Journal of Biological Macromolecules Elsevier**, 1 Nov. 2024. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181302406749>. Acesso em: 19 ago. 2025

MURPHY, M. et al. Quaternary Ammonium Based Carboxyl Functionalized Ionic Liquid for Covalent Immobilization of Horseradish Peroxidase and Development of Electrochemical Hydrogen Peroxide Biosensor. **Electroanalysis**, v. 32, n. 11, p. 2422–2430, 1 Nov. 2020.

MUSA, A. A. et al. Nano-Enhanced Polymer Composite Materials: A Review of Current Advancements and Challenges. **Polymers**, v. 17, n. 7, p. 893, 26 Mar. 2025.

MUTLU AVINÇ, G.; YILDIZ, A. A bibliometric and systematic review of scientific publications on metaverse research in architecture: web of science (WoS). **International Journal of Technology and Design Education**, v. 35, n. 2, p. 825–849, 1 Apr. 2025.

NAGY, C.; SZABO, R.; GASPAR, A. Microfluidic Immobilized Enzymatic Reactors for Proteomic Analyses—Recent Developments and Trends (2017–2021). **Micromachines**, v. 13, n. 2, p. 311, 17 Feb. 2022.

NAWAZ, A. F. et al. Use of Nanomaterials for the Immobilization of Industrially Important Enzymes. **Journal of Nanotechnology Research**, v. 03, n. 04, p. 45–57, 2021.

NEIRA, H. D.; JEEAWOODY, S.; HERR, A. E. Reversible Functionalization of Clickable Polyacrylamide Gels with Protein and Graft Copolymers. **Advanced Functional Materials**, v. 30, n. 45, p. 2005010, 1 Nov. 2020.

NETO, D. M. A. et al. A novel amino phosphonate-coated magnetic nanoparticle as MRI contrast agent. **Applied Surface Science**, v. 543, p. 148824, 30 Mar. 2021.

NGUYEN, H. H.; KIM, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. **Applied Science and Convergence Technology**, v. 26, n. 6, p. 157–163, 30 Nov. 2017.

NGUYEN, N. Y. et al. Drug-loaded Fe₃O₄/lignin nanoparticles to treat bacterial infections. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 289, p. 138868, 1 Feb. 2025.

NI, X. et al. Application Progress of Immobilized Enzymes in the Catalytic Synthesis of 1,3-Dioleoyl-2-palmitoyltriglyceride Structured Lipids. **Foods**, v. 14, n. 3, p. 475, 2 Feb. 2025.

NIAN, B.; LI, X. Can deep eutectic solvents be the best alternatives to ionic liquids and organic solvents: A perspective in enzyme catalytic reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 217, p. 255–269, 30 Sep. 2022.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. **Journal of**

Cheminformatics, v. 3, n. 10, p. 1–14, 7 Oct. 2011.

OKE, M. A. et al. Nanotechnology and enzyme immobilization: a review. **Nanotechnology**, v. 34, n. 38, p. 385101, 3 Jul. 2023.

PARANDI, E. et al. Lipase enzyme immobilized over magnetic titanium graphene oxide as catalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 173, p. 106794, 1 Jun. 2023.

PATIL, P. D. et al. Defect metal-organic frameworks (D-MOFs): An engineered nanomaterial for enzyme immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 531, p. 216519, 15 May 2025.

PATTI, S. et al. Advances and Challenges in the Development of Immobilized Enzymes for Batch and Flow Biocatalyzed Processes. **ChemSusChem**, v. 18, n. 8, p. e202402007, 14 Apr. 2025.

PÉREZ-GONZÁLEZ, C. et al. Bioelectronic tongue dedicated to the analysis of milk using enzymes linked to carboxylated-PVC membranes modified with gold nanoparticles. **Food Control**, v. 145, p. 109425, 1 Mar. 2023.

PÉREZ-TOMÁS, J. Á. et al. Entrapment in HydrIL gels: Hydro-Ionic Liquid polymer gels for enzyme immobilization. **Catalysis Today**, v. 432, p. 114595, 15 Apr. 2024.

PIROZZI, D.; LATTE, A.; SANNINO, F. Immobilization of Lipases on Chitosan Hydrogels Improves Their Stability in the Presence of the Products of Triglyceride Oxidation. **Gels**, v. 9, n. 10, p. 776, 1 Oct. 2023.

PRABHAKAR, T. et al. Covalent immobilization: A review from an enzyme perspective. **Chemical Engineering Journal**, v. 503, p. 158054, 1 Jan. 2025.

QIAN, J. et al. Immobilization of lipase on silica nanoparticles by adsorption followed by glutaraldehyde cross-linking. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 1, p. 25–38, 1 Jan. 2023.

QIU, X. et al. Organic-inorganic nanocomposites fabricated via functional ionic liquid as the bridging agent for Laccase immobilization and its application in 2,4-dichlorophenol removal. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, p. 260–269, 1 Jul. 2019.

QUEISSADA, D. D.; DA SILVA, J. A. Imobilização enzimática em suportes orgânicos e inorgânicos: vantagens e desvantagens. **Holos Environment**, v. 20, n. 2, p. 271, 2020.

RALBOVSKY, N. M.; SMITH, J. P. Machine Learning and Chemical Imaging to Elucidate Enzyme Immobilization for Biocatalysis. **Analytical Chemistry**, v. 93, n. 35, p. 11973–11981, 7 Sep. 2021.

RAMLEE, N. N. et al. Biochemical and Physical Characterization of Immobilized *Candida rugosa* Lipase on Metal Oxide Hybrid Support. **Catalysts**, v. 12, n. 8, p. 854, 1 Aug. 2022.

REMONATTO, D. et al. Production of FAME and FAEE via Alcoholysis of Sunflower Oil by

Eversa Lipases Immobilized on Hydrophobic Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 185, n. 3, p. 705–716, 1 Jul. 2018.

REMONATTO, D. et al. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1–20, 1 Mar. 2022.

REZAEI, B. et al. Magnetic Nanoparticles: A Review on Synthesis, Characterization, Functionalization, and Biomedical Applications. **Small**, v. 20, n. 5, p. 2304848, 1 Feb. 2024.

RIBEIRO, E. S. et al. Chitosan-based nanofibers for enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1959–1970, 31 Jul. 2021.

RICCÒ, R. et al. Metal-Organic Frameworks for Cell and Virus Biology: A Perspective. **ACS Nano**, v. 12, n. 1, p. 13–23, 23 Jan. 2018.

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

ROBESCU, M. S.; BAVARO, T. A Comprehensive Guide to Enzyme Immobilization: All You Need to Know. **Molecules**, v. 30, n. 4, p. 939, 18 Feb. 2025.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 4, p. 1155–1166, 1 Apr. 2021.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 1 Sep. 2019.

RODRIGUES, R. C. et al. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalent attachment and other stabilization strategies. **Biotechnology Advances**, v. 52, p. 107821, 15 Nov. 2021.

ROGACKA, J.; LABUS, K. Metal–organic frameworks as highly effective platforms for enzyme immobilization—current developments and future perspectives. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, p. 1–29, 18 Oct. 2024.

ROJAS, J. Improved polymer functionality by cross-linking with glutaraldehyde to achieve controlled drug release. In: **Excipient Applications in Formulation Design and Drug Delivery**. [s.l.] Springer, Cham, 2015. p. 569–588.

RUSU, A. G. et al. Synthesis and Comparative Studies of Glucose Oxidase Immobilized on Fe₃O₄ Magnetic Nanoparticles Using Different Coupling Agents. **Nanomaterials**, v. 12, n. 14, p. 2445, 17 Jul. 2022.

RUXANDRA LEONTIEȘ, A. et al. Laccase immobilized on chitosan-polyacrylic acid microspheres as highly efficient biocatalyst for naphthol green B and indigo carmine degradation. **Chemical Engineering Journal**, v. 439, p. 135654, 1 Jul. 2022.

SABI, G. J. et al. Enzyme loading in the support and medium composition during immobilization alter activity, specificity and stability of octyl agarose-immobilized Eversa Transform. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 295, p. 139667, 1 Mar. 2025.

SÁNCHEZ-MORÁN, H. et al. Framework for Optimizing Polymeric Supports for Immobilized Biocatalysts by Computational Analysis of Enzyme Surface Hydrophobicity. **ACS Catalysis**, v. 13, n. 7, p. 4304–4315, 7 Apr. 2023.

SANTOS, J. C. S. et al. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnology Reports**, v. 14, p. 16–26, 1 Mar. 2017.

SANTOS, K. M. et al. Enhanced Biodiesel Production with Eversa Transform 2.0 Lipase on Magnetic Nanoparticles. **Langmuir**, v. 40, n. 51, p. 26835–26851, 24 Dec. 2024.

SHARON, M.; NANDGAVKAR, I.; SHARON, M. Platinum nanocomposites and its applications: A review. **Advances in Materials Research (South Korea)**, v. 6, n. 2, p. 129–153, 1 Jun. 2017.

SHELDON, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 92, n. 3, p. 467–477, 2 Nov. 2011.

SHEN, J. et al. Advances in 3D Gel Printing for Enzyme Immobilization. **Gels**, v. 8, n. 8, p. 460, 22 Jul. 2022.

SHER, H. et al. Enzyme Immobilization on Metal-Organic Framework (MOF): Effects on Thermostability and Function. **Protein & Peptide Letters**, v. 26, n. 9, p. 636–647, 18 Jun. 2019.

SIGMA-ALDRICH. **Lipase, produced by *Aspergillus oryzae* (100 LCLU/g) - Eversa Transform 2.0**. Disponível em: https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/sae0065?srsId=AfmBOoq7Pkf9fK8jGSGLwIRR0FbYRWf5AJfltYtC_VE87Go7p80633ZJ&icid=sharepdp-clipboard-copy-productdetailpage. Acesso em: 8 jul. 2025.

SILVA, G. R. DA et al. Refinement of Crystal Structure and its Application for Catalytic Materials. **European Journal of Inorganic Chemistry**, v. 28, n. 21, p. e202500051, 29 Jul. 2025.

SILVA, J. M. F. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on a new hydrophobic support (Streamline phenylTM): Strategies to improve stability and reusability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 163, p. 110166, 1 Feb. 2023.

SIMIĆ, S. et al. Shortening Synthetic Routes to Small Molecule Active Pharmaceutical Ingredients Employing Biocatalytic Methods. **Chemical Reviews**, v. 122, n. 1, p. 1052–1126, 12 Jan. 2022.

SIMOVIĆ, M. et al. Whey valorization using transgalactosylation activity of immobilized β -

galactosidase. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 11, p. 3074–3082, 1 Nov. 2019.

SINGH, N. et al. Revolutionizing enzyme engineering through artificial intelligence and machine learning. **Emerging Topics in Life Sciences**, v. 5, n. 1, p. 113–125, 14 May 2021.

SOUSA, I. G. DE et al. A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 42, n. 2, p. 151–172, 2024.

SOUZA, T. C. et al. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (R)-Indanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58–69, 1 Aug. 2016.

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

SOWAN, E. et al. Innovative Approaches to Enhanced Enzymatic Microalgae-to Biodiesel Production. **ChemBioEng Reviews**, v. 10, n. 6, p. 860–883, 1 Dec. 2023.

STANISZ, M. et al. Tailoring Lignin-Based Spherical Particles as a Support for Lipase Immobilization. **Catalysts**, v. 12, n. 9, p. 1031, 10 Sep. 2022.

SUN, S.; HU, B. A novel method for the synthesis of glyceryl monocateate by the enzymatic transesterification and kinetic analysis. **Food Chemistry**, v. 214, p. 192–198, 1 Jan. 2017.

ŚWIDEREK, K. et al. Advances in the Simulations of Enzyme Reactivity in the Dawn of the Artificial Intelligence Age. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 15, n. 1, p. e70003, 1 Jan. 2025.

SYUKRI, M. S. M. et al. Optimization strategy for laccase immobilization on polyethylene terephthalate grafted with maleic anhydride electrospun nanofiber mat. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 876–883, 1 Jan. 2021.

T.SRIWONG, K.; MATSUDA, T. Recent Advances in Enzyme Immobilization Utilizing Nanotechnology for Biocatalysis. **Organic Process Research and Development**, v. 26, n. 7, p. 1857–1877, 15 Jul. 2022.

TADESSE, M.; LIU, Y. Recent Advances in Enzyme Immobilization: The Role of Artificial Intelligence, Novel Nanomaterials, and Dynamic Carrier Systems. **Catalysts**, v. 15, n. 6, p. 571, 9 Jun. 2025.

TAN, R. et al. Interfacial effects of Cu/Fe₃O₄ in water-gas shift reaction: Role of Fe₃O₄ crystallite sizes. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 78, p. 741–752, 12 Aug. 2024.

TOMSON, M. B.; KAN, A. T.; ODDO, J. E. Acid/Base and Metal Complex Solution Chemistry of the Polyphosphonate DTPMP versus Temperature and Ionic Strength. **Langmuir**, v. 10, n. 5, p. 1442–1449, 1 May 1994.

TOSCANO, L. et al. Comparison of the performances of four hydrophilic polymers as supports for lipase immobilisation. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 28, n. 1, p. 52–60, 2014.

TRIPATHI, M. et al. Bioderived nanostructure and their functional contribution in immobilization of cellulolytic enzymes for improving biosensing application. **Journal of Molecular Structure**, v. 1321, p. 139811, 5 Feb. 2025.

TU, H. et al. Magnetic thermosensitive polymer composite carrier with target spacing for enhancing immobilized enzyme performance. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 150, p. 109896, 1 Oct. 2021.

ULU, A. et al. Design of near-infrared light induced functionalized upconverting nanoparticles as support in enzyme immobilization: Enhanced biocatalyst activity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 302, p. 140581, 1 Apr. 2025.

UPADHYAY, S.; PAREKH, K.; PANDEY, B. Influence of crystallite size on the magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 678, p. 478–485, 5 Sep. 2016.

URREA, D. A. M. et al. Immobilization of horseradish peroxidase in Ca-alginate beads: Evaluation of the enzyme leakage on the overall removal of an azo-dye and mathematical modeling. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 156, p. 134–143, 1 Dec. 2021.

URRUTIA, P. et al. Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 108, p. 674–686, 1 Mar. 2018.

VASILESCU, C. et al. Development of a Tailored Sol-Gel Immobilized Biocatalyst for Sustainable Synthesis of the Food Aroma Ester n-Amyl Caproate in Continuous Solventless System. **Foods**, v. 11, n. 16, p. 2485, 1 Aug. 2022.

VEGA, A.; PLANAS, A.; BIARNÉS, X. A Practical Guide to Computational Tools for Engineering Biocatalytic Properties. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 3, p. 980, 24 Jan. 2025.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 21 Apr. 2000.

WALCARIUS, A. et al. Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: Recent trends. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 38, p. 4878–4908, 11 Sep. 2013.

WAN, Y. et al. Electrostatically Mediated In Situ Polymerization for Enzyme Immobilization and Activation. **Biomacromolecules**, v. 25, n. 2, p. 809–818, 12 Feb. 2024.

WANG, B. et al. Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on

rapeseed protein by immobilized Alcalase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 307–313, 1 Sep. 2016.

WANG, C.; LIAO, K. Recent Advances in Emerging Metal- And Covalent-Organic Frameworks for Enzyme Encapsulation. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 13, n. 48, p. 56752–56776, 8 Dec. 2021.

WANG, H. et al. Immobilized polyphenol oxidase: Preparation, optimization and oxidation of phenolic compounds. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 160, p. 233–244, 1 Oct. 2020.

WANG, H. et al. Enzyme-functionalized structural color hydrogel particles for urea detection and elimination. **Journal of Cleaner Production**, v. 315, p. 128149, 15 Sep. 2021.

WANG, N. et al. The current research status of immobilized lipase performance and its potential for application in food are developing toward green and healthy direction: A review. **Journal of Food Science**, v. 90, n. 2, p. e70038, 1 Feb. 2025a.

WANG, X.; LAN, P. C.; MA, S. Metal-Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials. **ACS Central Science**, v. 6, n. 9, p. 1497–1506, 23 Sep. 2020.

WANG, Z. et al. Robust enzyme discovery and engineering with deep learning using CataPro. **Nature Communications**, v. 16, n. 1, p. 1–16, 20 Mar. 2025b.

WEBER, A. C. et al. Immobilization of commercial horseradish peroxidase in calcium alginate-starch hybrid support and its application in the biodegradation of phenol red dye. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 246, p. 125723, 15 Aug. 2023.

WEI, H.; SMITH, J. P. Modernized Machine Learning Approach to Illuminate Enzyme Immobilization for Biocatalysis. **ACS Central Science**, v. 9, n. 10, p. 1913–1926, 25 Oct. 2023.

WENG, Y. et al. Improved enzyme thermal stability, loading and bioavailability using alginate encapsulation. **Food Hydrocolloids**, v. 137, p. 108385, 1 Apr. 2023a.

WENG, Y. et al. Alginate-based materials for enzyme encapsulation. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 318, p. 102957, 1 Aug. 2023b.

WONGWATANAPAIBOON, J. et al. Overexpression of *Fusarium solani* lipase in *Pichia pastoris* and its application in lipid degradation. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 30, n. 5, p. 885–893, 2 Sep. 2016.

XIE, J. et al. Degradation of 2,4-DCP by immobilized laccase on modified biochar carrier. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 11, p. 1591–1611, 1 Nov. 2023.

XIE, J.; ZHANG, Y.; SIMPSON, B. Food enzymes immobilization: novel carriers, techniques and applications. **Current Opinion in Food Science**, v. 43, p. 27–35, 1 Feb. 2022.

XIE, W.; HUANG, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposite: Characterization and application for biodiesel production. **Energy**

Conversion and Management, v. 159, p. 42–53, 1 Mar. 2018.

XU, C. et al. Cellulase immobilization to enhance enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: An all-inclusive review. **Carbohydrate Polymers**, v. 321, p. 121319, 1 Dec. 2023a.

XU, K. et al. Recent advances in enzyme immobilization based on nanoflowers. **Journal of Catalysis**, v. 418, p. 31–39, 1 Feb. 2023b.

XU, M. Q. et al. Combined cross-linked enzyme aggregates as biocatalysts. **Catalysts**, v. 8, n. 10, p. 460, 17 Oct. 2018.

YAMAGUCHI, H.; KIYOTA, Y.; MIYAZAKI, M. Techniques for Preparation of Cross-Linked Enzyme Aggregates and Their Applications in Bioconversions. **Catalysts** **2018**, Vol. **8**, Page **174**, v. 8, n. 5, p. 174, 24 Apr. 2018.

YANG, D. et al. Recent advances in glucose-oxidase-based nanocomposites for diabetes diagnosis and treatment. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 11, n. 32, p. 7582–7608, 6 Sep. 2023a.

YANG, W. et al. Chitosan and whey protein bio-inks for 3d and 4d printing applications with particular focus on food industry. **Molecules**, v. 27, n. 1, p. 173, 28 Dec. 2022.

YANG, W. et al. Hollow Porous Carbon Nanofibers with Fe-N-C Modified by Fe₃O₄ Nanoparticles for Enhancing Mass Transfer for Boosting the Oxygen Reduction Reaction. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 11, n. 24, p. 8884–8892, 19 Jun. 2023b.

YAO, L. W. et al. Insight into immobilization efficiency of Lipase enzyme as a biocatalyst on the graphene oxide for adsorption of Azo dyes from industrial wastewater effluent. **Journal of Molecular Liquids**, v. 354, p. 118849, 15 May 2022.

YOUSEFZADEH, F.; SALAVATI-NIASARI, M.; GHANBARI, · MOJGAN. Visible light photocatalytic degradation of water-soluble organic pollutants in aqueous solution by thulium copper oxide nanostructures: sonochemical synthesis, characterization, optimization of conditions, and mechanisms. **Applied Water Science** **2025**, v. 15, n. 2, p. 1–13, 11 Jan. 2025.

YU, S. et al. Preparation and application of laccase-immobilized magnetic biochar for effective degradation of endocrine disruptors: Efficiency and mechanistic analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 305, p. 141167, 1 May 2025.

ZAAK, H. et al. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 67–74, 1 Nov. 2017.

ZAHIRINEJAD, S. et al. Nano-organic supports for enzyme immobilization: Scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, p. 111774, 1 Aug. 2021.

ZANUSO, E. et al. Enzyme immobilization as a strategy towards efficient and sustainable lignocellulosic biomass conversion into chemicals and biofuels: current status and perspectives. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 5, n. 17, p. 4233–4247, 24 Aug. 2021.

ZAPPONE, M.; KAZISKA, A.; BOGUSH, G. Applications of Detergent in Laundering. In: ZOLLER, U. (Ed.). **Handbook of Detergents, Part E: Applications**. Boca Raton: CRC Press, p. 69–82, 2009.

ZAVALA, V. R. et al. Challenges and innovations in green hydrogen storage technologies. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 113, p. 322–339, 27 Mar. 2025.

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

ZEYADI, M.; ALMULAIKY, Y. Q. Chitosan-Based metal-organic framework for Stabilization of β -glucosidase: Reusability and storage stability. **Heliyon**, v. 9, n. 11, p. 2405–8440, 1 Nov. 2023.

ZHANG, D. H.; YUWEN, L. X.; PENG, L. J. Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. **Journal of Chemistry**, v. 2013, n. 1, p. 946248, 1 Jan. 2013.

ZHANG, H. et al. Recent advancements in encapsulation of chitosan-based enzymes and their applications in food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 32, p. 11044–11062, 21 Dec. 2022.

ZHANG, X. et al. Conformation-Dependent Coordination of Carboxylic Acids with Fe₃O₄ Nanoparticles Studied by ATR-FTIR Spectral Deconvolution. **Langmuir**, v. 35, n. 17, p. 5770–5778, 30 Apr. 2019.

ZHANG, Y. et al. Electrochemical biosensor based on copper sulfide/reduced graphene oxide/glucose oxidase construct for glucose detection. **Analytical Biochemistry**, v. 696, p. 115696, 1 Jan. 2025a.

ZHANG, Z. et al. Sonochemical synthesis of high-performance MgCo₂O₄ nanostructures as cathode material for the assembly of hybrid supercapacitor. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 103, p. 12–22, 17 Feb. 2025b.

ZHAO, D. et al. The application of chitin materials in enzymatic catalysis: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 352, p. 123172, 15 Mar. 2025.

ZHENG, F. et al. Immobilization of laccase onto chitosan beads to enhance its capability to degrade synthetic dyes. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 110, p. 69–78, 1 May 2016.

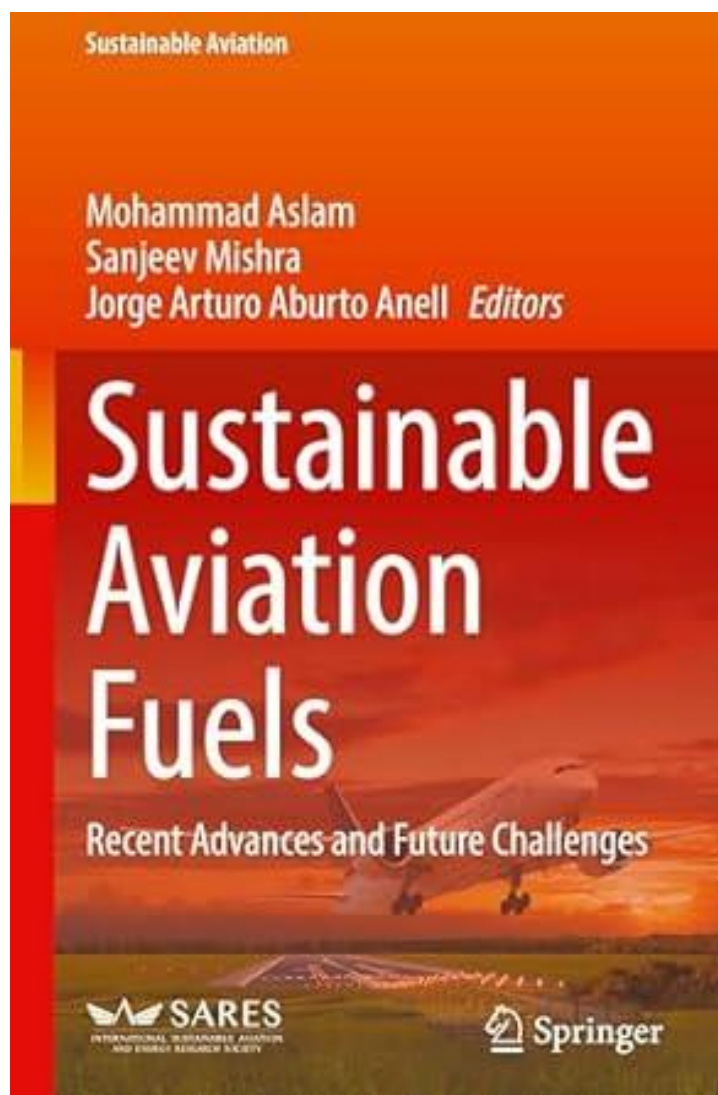
ZHOU, J. et al. Co-immobilized Alcohol Dehydrogenase and Glucose Dehydrogenase with Resin Extraction for Continuous Production of Chiral Diaryl Alcohol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 9, p. 2742–2758, 1 Sep. 2021a.

ZHOU, Y. et al. One-Pot Synthesis of Multiple Stimuli-Responsive Magnetic Nanomaterials Based on the Biomineralization of Elastin-like Polypeptides. **ACS Omega**, v. 6, n. 42, p. 27946–27954, 26 Oct. 2021b.

ZHU, Q. et al. Enzyme immobilization on covalent organic framework supports. **Nature Protocols**, v. 18, n. 10, p. 3080–3125, 6 Sep. 2023.

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules** **2016**, vol. 21, n. 11, p. 1577, 19 Nov. 2016.

ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 9 Sep. 2014.

ANEXO A - PUBLICAÇÃO DE CAPÍTULO DE LIVRO

Valdilane Santos Alexandre & **Érico Carlos de Castro**.

Capítulo 14 - Sustainable Aviation Biofuels: Progress and Challenges.

Livro: Sustainable Aviation Fuels: Recent Advances and Future Challenges, p. 333, 2025.

ANEXO B - PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS

1. Antônio Luthierre Gama Cavalcante, Dayana Nascimento Dari, Francisco Izaías da Silva Aires, **Erico Carlos de Castro**, Kaiany Moreira dos Santos, José Cleiton Sousa dos Santos. Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: toward sustainable industrial applications. **Royal Society of Chemistry advances**, v. 14, n. 25, p. 17946-17988, 2024.
2. Viviane de Castro Bizerra, Rafael Leandro Fernandes Melo, Francisco Simão Neto, **Erico Carlos de Castro**, Misael Bessa Sales, Paulo Gonçalves de Sousa Junior, Dayana Nascimento Dari, Francisco Izaías da Silva Aires, Kaiany Moreira dos Santos, Juliana de França Serpa, Tak H. Kim, Jesús Fernández-Lucas, Maria Cristiane Martins de Souza, José C.S. dos Santos. Exploring the synergy of ionic liquids and lipase in sustainable enzymatic engineering. *Journal of Molecular Liquids*, **Journal of Molecular Liquids**, v. 399, p. 124373, 2024.
3. Dayana Nascimento Dari, Isabelly Silveira Freitas, Francisco Izaías da Silva Aires, Rafael Leandro Fernandes Melo, Kaiany Moreira dos Santos, Patrick da Silva Sousa, Paulo Gonçalves de Sousa Junior, Antônio Luthierre Gama Cavalcante, Francisco Simão Neto, Jessica Lopes da Silva, **Érico Carlos de Castro**, Valdilane Santos Alexandre, Ana M. da S. Lima, Juliana de França Serpa, Maria C. M. de Souza and José C. S. dos Santos. An updated review of recent applications and perspectives of hydrogen production from biomass by fermentation: A comprehensive analysis. **Biomass**, v. 4, n. 1, p. 132-163, 2024.
4. Francisco Izaías da Silva Aires, Dayana Nascimento Dari, Isabelly Silveira Freitas, Jessica Lopes da Silva, José Roberto de Matos Filho, Kaiany Moreira dos Santos, Viviane de Castro Bizerra, Misael Bessa Sales, Francisco Lucas de Souza Magalhães, Patrick da Silva Sousa, Francisco Simão Neto, Paulo Gonçalves de Sousa Junior, Antônio Luthierre Gama Cavalcante, **Érico Carlos de Castro**, Rafael Leandro Fernandes Melo & José Cleiton Sousa dos Santos. Advanced and prospects in phenol wastewater treatment technologies: unveiling opportunities and trends. **Discover Water**, v. 4, n. 20, p. 20, 2024.

ANEXO C – ARTIGOS UTILIZADOS NA BASE DE DADOS DA REVISÃO BIBLIOMÉTRICA

1. ABALYMOV, A. et al. Alkaline Phosphatase Delivery System Based on Calcium Carbonate Carriers for Acceleration of Ossification. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 5, p. 2986–2996, 18 May 2020.
2. ABURTO, J. et al. Stability and catalytic properties of chloroperoxidase immobilized on SBA-16 mesoporous materials. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 83, n. 1–3, p. 193–200, 2005.
3. AGGARWAL, S. et al. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 962–986, 2021.
4. ALI, Z. et al. Immobilization of lipase on iron oxide organic/inorganic hybrid particles: A review article. **Reviews on Advanced Materials Science**, v. 53, 2018. Disponível em: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/rams-2018-0008/html>. Acesso em: 20 set. 2025
5. ALNOCH, R. C. et al. Recent trends in biomaterials for immobilization of lipases for application in non-conventional media. **Catalysts**, v. 10, n. 6, p. 1–29, 2020.
6. AMARANDEI, C. A. et al. Glucose oxidase “wired” with potassium ferricyanide polypyrrole films. **UPB Scientific Bulletin, Series B: Chemistry and Materials Science**, v. 74, n. 3, p. 19–36, 2012.
7. AN, S. et al. Photoimageable Organic Coating Bearing Cyclic Dithiocarbonate for a Multifunctional Surface. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 14, n. 2, p. 3274–3283, 19 Jan. 2022.
8. APETREI, R. M. et al. Sensitivity enhancement for microbial biosensors through cell Self-Coating with polypyrrole. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 68, n. 17, p. 1058–1067, 2019.
9. ARAÚJO, E. V. et al. Advances in surface design and biomedical applications of magnetic nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 328, p. 103166, 2024.
10. ASUNCIÓN MOLINA, M. et al. Sustainable one-pot immobilization of enzymes in/on metal-organic framework materials. **Catalysts**, v. 11, n. 8, p. 1002, 2021.
11. AURIEMMA, F. et al. Nano-in-Nano Approach for Enzyme Immobilization Based on Block Copolymers. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 34, p. 29318–29327, 30 Aug. 2017.

12. AZHAGAPILLAI, P. et al. Immobilization of soybean peroxidase enzyme on hierarchical zeolite-ordered mesoporous carbon nanocomposite and its activity. **RSC Advances**, v. 15, n. 8, p. 5781–5794, 2025.
13. BALTA, Z.; BILGIN SIMSEK, E.; SALOGLU, D. Bio-inspired functional photocatalyst: Lipase enzyme functionalized TiO₂ with excellent photocatalytic, enzymatic, and antimicrobial performance. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 438, p. 114565, 2023.
14. BARRECA, D. et al. Covalently immobilized catalase on functionalized graphene: Effect on the activity, immobilization efficiency, and tetramer stability. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 12, p. 3231–3240, 2018.
15. BASU, A. K. et al. Poly-L-Lysine functionalised MWCNT-rGO nanosheets based 3-d hybrid structure for femtomolar level cholesterol detection using cantilever based sensing platform. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 3686, 2019.
16. BELLO-GIL, D. et al. Poly-3- hydroxybutyrate functionalization with BioFtagged recombinant proteins. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 4, p. e02595-17, 1 Feb. 2018.
17. BELLOU, M. G. et al. Tyrosinase Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates: Biocatalytic Study in Deep Eutectic Solvent Aqueous Solutions. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 643, 2023a.
18. BELLOU, M. G. et al. Tyrosinase Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates: Biocatalytic Study in Deep Eutectic Solvent Aqueous Solutions. **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 22932–22940, 19 Jun. 2023b.
19. BERNAL, C. et al. New non-covalent functionalized phenyl-methyl-silica for biomolecules immobilization: Experimental and theoretical insights of interactions. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 242, p. 152–159, 2017.
20. BERNAL, C.; POVEDA-JARAMILLO, J. C.; MESA, M. Raising the enzymatic performance of lipase and protease in the synthesis of sugar fatty acid esters, by combined ionic exchange -hydrophobic immobilization process on aminopropyl silica support. **Chemical Engineering Journal**, v. 334, p. 760–767, 2018.
21. BHANGALE, A. S.; BEERS, K. L.; GROSS, R. A. Enzyme-catalyzed polymerization of end-functionalized polymers in a microreactor. **Macromolecules**, v. 45, n. 17, p. 7000–7008, 11 Sep. 2012.
22. BILAL, M. et al. Graphene-based nanoarchitectures as ideal supporting materials to develop multifunctional nanobiocatalytic systems for strengthening the biotechnology

- industry. **Chemical Engineering Journal**, p. 139509, 452AD.
23. BILAL, M. et al. Magnetic nanoparticles as versatile carriers for enzymes immobilization: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2530–2544, 2018.
 24. BILAL, M. et al. Multi-point enzyme immobilization, surface chemistry, and novel platforms: a paradigm shift in biocatalyst design. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 202–219, 17 Feb. 2019.
 25. BILAL, M. et al. Surface-coated magnetic nanostructured materials for robust biocatalysis and biomedical applications-A review. **Journal of Advanced Research**, v. 38, p. 157–177, 2022a.
 26. BILAL, M. et al. Engineering magnetic nanobiocatalytic systems with multipurpose functionalities for biocatalysis, biotechnology and bioprocess applications. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 30, 2022b.
 27. BILAL, M.; BARCELÓ, D.; IQBAL, H. M. N. Nanostructured materials for harnessing the power of horseradish peroxidase for tailored environmental applications. **Science of the Total Environment**, v. 749, p. 142360, 2020.
 28. BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 388, p. 1–23, 2019.
 29. BIRKHEUR, S. et al. Diphenyltetrazole modified bacterial cellulose film: Considerations on heterogeneous modification and bioconjugation. **Materials Research**, v. 23, n. 4, p. 20200197, 2020.
 30. BIUNDO, A. et al. Characterization of a poly(butylene adipate-co-terephthalate)-hydrolyzing lipase from *Pelosinus fermentans*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 4, p. 1753–1764, 1 Feb. 2016.
 31. BLANCO, F. G. et al. Enzybiotic-mediated antimicrobial functionalization of polyhydroxyalkanoates. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, p. 1220336, 2023.
 32. BOCCHETTA, P. et al. Chitosan in electrochemical (bio)sensors: nanostructuring and methods of synthesis. **European Polymer Journal**, v. 213, p. 113092, 2024.
 33. BOHARA, R. A.; THORAT, N. D.; PAWAR, S. H. Role of functionalization: Strategies to explore potential nano-bio applications of magnetic nanoparticles. **RSC Advances**, v. 6, n. 50, p. 43989–44012, 2016.
 34. BOI, S. et al. Encapsulated functionalized stereocomplex PLA particles: An effective

- system to support mucolytic enzymes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 179, p. 190–198, 2019.
35. BOLINA, I. C. A. et al. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2354–2365, 2018.
 36. BOLIVAR, J. M. et al. Mesoporous Silica Materials Labeled for Optical Oxygen Sensing and Their Application to Development of a Silica-Supported Oxidoreductase Biocatalyst. **ACS Catalysis**, v. 5, n. 10, p. 5984–5993, 2 Oct. 2015.
 37. BONCEL, S. et al. Alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* non-covalently immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of Solketal esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 53, n. 4, p. 263–270, 2013.
 38. BOURKAIB, M. C. et al. APTES modified SBA15 and meso-macro silica materials for the immobilization of aminoacylases from *Streptomyces ambofaciens*. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 323, p. 111226, 2021.
 39. BROWNLEE, B. J. et al. Electrochemical Glucose Sensors Enhanced by Methyl Viologen and Vertically Aligned Carbon Nanotube Channels. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 34, p. 28351–28360, 29 Aug. 2018.
 40. BUK, V.; PEMBLE, M. E.; TWOMEY, K. Fabrication and evaluation of a carbon quantum dot/gold nanoparticle nanohybrid material integrated onto planar micro gold electrodes for potential bioelectrochemical sensing applications. **Electrochimica Acta**, v. 293, p. 307–317, 2019.
 41. BÜSCHER, N. et al. Biocatalyst Immobilization by Anchor Peptides on an Additively Manufacturable Material. **Organic Process Research and Development**, v. 23, n. 9, p. 1852–1859, 20 Sep. 2019.
 42. ÇAKMAKÇI, E.; DEMIR, S. Nonhydrolytic sol–gel synthesized oligosiloxane resin reinforced thiol-ene photocured coatings for the immobilization of acetylcholinesterase. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 91, n. 1, p. 72–81, 15 Jul. 2019.
 43. ÇAKMAKÇI, E.; YUCE-DURSUN, B.; DEMIR, S. Maleic anhydride functionalization of OSTE based coatings via thiol-ene “Click” reaction for the covalent immobilization of xylanase. **Reactive and Functional Polymers**, v. 111, p. 38–43, 2017.
 44. CALDAS, M. et al. Silane Grafted Biosourced Melanin: A Sustainable Approach for Nanobiosensing Applications. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 12, n. 6,

- p. 2149–2161, 12 Feb. 2024.
45. CALIFANO, D. et al. Diaminated Cellulose Beads as a Sustainable Support for Industrially Relevant Lipases. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 12, n. 20, p. 7703–7712, 20 May 2024.
 46. CANG-RONG, J. T.; PASTORIN, G. The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: Investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. **Nanotechnology**, v. 20, n. 25, p. 255102, 2009.
 47. CANILHO, N. et al. Isocyanate-mediated covalent immobilization of *Mucor miehei* lipase onto SBA-15 for transesterification reaction. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 112, p. 139–145, 2013.
 48. CAZABAN, D.; WILSON, L.; BETANCOR, L. Lipase Immobilization on Siliceous Supports: Application to Synthetic Reactions. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 96–103, 2016.
 49. CERQUEIRA, M. R. F. et al. A novel functionalisation process for glucose oxidase immobilisation in poly(methyl methacrylate) microchannels in a flow system for amperometric determinations. **Talanta**, v. 126, p. 20–26, 2014.
 50. CERQUEIRA, M. R. F.; ANGNES, L.; MATOS, R. C. Electrochemical Measurements of Glucose Using a Micro Flow-Through Immobilized Enzyme Reactor. **Electroanalysis**, v. 29, n. 5, p. 1474–1480, 1 May 2017.
 51. CHAROENPOL, A. et al. Marine chitin upcycling with immobilized chitinolytic enzymes: current state and prospects. **Green Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 467–489, 2022.
 52. CHE MARZUKI, N. H. et al. Sustainable production of the emulsifier methyl oleate by *Candida rugosa* lipase nanoconjugates. **Food and Bioproducts Processing**, v. 96, p. 211–220, 2015.
 53. CHENG, K.; LANDRY, C. C. Diffusion-based deprotection in mesoporous materials: A strategy for differential functionalization of porous silica particles. **Journal of the American Chemical Society**, v. 129, n. 31, p. 9674–9685, 8 Aug. 2007.
 54. CHOU, C. et al. Bioinspired Pseudozwitterionic Hydrogels with Bioactive Enzyme Immobilization via pH-Responsive Regulation. **Langmuir**, v. 35, n. 5, p. 1909–1918, 5 Feb. 2019.
 55. CIPOLATTI, E. et al. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.
 56. CLARK, J. et al. The application of modified mesoporous silicas in liquid phase catalysis.

- Dalton Transactions**, v. 36, p. 4297–4309, 2006.
57. COLACICCO, A. et al. Valorization of Apple Pomace: Production of Phloretin Using a Bacterial Cellulose-Immobilized β -Glycosidase. **ChemSusChem**, v. 18, n. 13, p. 2500592, 1 Jul. 2025.
 58. CONTE, M. P.; LAU, K. H. A.; ULIJN, R. V. Biocatalytic self-assembly using reversible and irreversible enzyme immobilization. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, n. 4, p. 3266–3271, 1 Feb. 2017.
 59. CORADI, M. et al. Production of antimicrobial textiles by cotton fabric functionalization and pectinolytic enzyme immobilization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 208, p. 28–34, 2018.
 60. CORRALES-UREÑA, Y. R. et al. Functionalization of hydrophobic surfaces with antimicrobial peptides immobilized on a bio-interfactant layer. **RSC Advances**, v. 10, n. 1, p. 376–386, 2019.
 61. COSCOLÍN, C. et al. Controlled manipulation of enzyme specificity through immobilization-induced flexibility constraints. **Applied Catalysis A: General**, v. 565, p. 59–67, 2018.
 62. COSTA, J. B. et al. Enhanced biocatalytic sustainability of laccase by immobilization on functionalized carbon nanotubes/polysulfone membranes. **Chemical Engineering Journal**, v. 355, p. 974–985, 2019.
 63. COSTANTINI, A.; CALIFANO, V. Lipase immobilization in mesoporous silica nanoparticles for biofuel production. **Catalysts**, v. 11, n. 5, p. 629, 2021.
 64. CRISPIM, J. F. et al. Bioactive Tape With BMP-2 Binding Peptides Captures Endogenous Growth Factors and Accelerates Healing After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction. **American Journal of Sports Medicine**, v. 46, n. 12, p. 2905–2914, 1 Oct. 2018.
 65. DA PONTE, G. et al. Atmospheric pressure plasma deposition of poly lactic acid-like coatings with embedded elastin. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 4, p. 345–352, 2014.
 66. DA SILVA, G. A. R. et al. Ethyl esters synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles. **Catalysis Today**, v. 445, p. 115099, 2025.
 67. DAMIATI, S.; SCHUSTER, B. Electrochemical biosensors based on S-layer proteins. **Sensors (Switzerland)**, v. 20, n. 6, p. 464–471, 23 Jan. 2020.
 68. DAMIATI, S.; SENSORS, B. S.-; 2020, U. Electrochemical biosensors based on S-layer proteins. **Sensors**, v. 20, n. 6, p. 1721, 2020.

69. DANIEL, M. et al. MOF based electrochemical sensors for the detection of physiologically relevant biomolecules: An overview. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 468, p. 214627, 2022.
70. DĂNILĂ, R. et al. Mesoporous MgFe₂O₄@ HaP@ APTES nanocomposite as scaffold for α -glucosidase coupling. **Materials Today Communications**, v. 36, p. 106427, 2023.
71. DAVIS, S. C. et al. Rapid flow-through biocatalysis with high surface area, enzyme-loaded carbon and gold-bearing diatom frustule replicas. **Advanced Functional Materials**, v. 23, n. 36, p. 4611–4620, 25 Sep. 2013.
72. DE BRITO, A. R. et al. Study of the interaction of the lactase enzyme immobilized in a carbon nanotube matrix for the development of the chemically modified carbon paste electrode. **Surfaces and Interfaces**, v. 20, p. 100592, 2020.
73. DE OLIVEIRA, T. P. et al. Incorporation of metallic particles in activated carbon used in lipase immobilization for production of isoamyl acetate. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 1736–1746, 1 Jul. 2022.
74. DECARPIGNY, C. et al. Effect of functional group on the catalytic activity of lipase B from *Candida antarctica* immobilized in a silica-reinforced pluronic F127/ α -cyclodextrin hydrogel. **Gels**, v. 8, n. 1, p. 3, 2022.
75. DEKA, J. R. et al. Roles of nanostructures and carboxylic acid functionalization of ordered cubic mesoporous silicas in lysozyme immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 213, p. 150–160, 2015.
76. DHARELA, R. et al. Stabilization of uricase by immobilization on poly(acrylic acid)-based nanogels for therapeutic and sensing applications. **Science of Advanced Materials**, v. 9, n. 7, p. 1280–1284, 2017.
77. DHARMARATNE, A. C. et al. Pyrenyl Carbon Nanotubes for Covalent Bilirubin Oxidase Biocathode Design: Should the Nanotubes be Carboxylated? **Electroanalysis**, v. 32, n. 5, p. 885–889, 1 May 2020.
78. DING, C. et al. Photothermal enhanced enzymatic activity of lipase covalently immobilized on functionalized Ti₃C₂TX nanosheets. **Chemical Engineering Journal**, v. 378, p. 122205, 2019.
79. DOĞAN, D. et al. Preparation and Characterization of Amino-Functionalized Zeolite/SiO₂ Materials for Trypsin–Chymotrypsin Co-immobilization. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 8, p. 2463–2477, 1 Aug. 2021.
80. DOHERTY, C. M. et al. Microfabrication of mesoporous silica encapsulated enzymes using deep X-ray lithography. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 32, p. 16191–

- 16195, 2012.
81. DRAGOI, B.; DUMITRIU, E. Candida antarctica lipase B immobilization onto hybrid organic-inorganic mesoporous materials. **Acta Chimica Slovenica**, v. 55, n. 2, p. 277–285, 2008.
 82. DUDAS, Z.; ALMASY, L. Effect of the Organic Groups on the Performance of Hybrid Silica Based Materials used as Supports for Biomolecules. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 27, p. 2760–2767, 2018.
 83. EHLERT, N. et al. Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coatings. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 131, n. 1–3, p. 51–57, 2010.
 84. EIXENBERGER, D. et al. Polymer-Grafted 3D-Printed Material for Enzyme Immobilization—Designing a Smart Enzyme Carrier. **Catalysts**, v. 13, n. 7, p. 1130, 2023.
 85. EL-MAISS, J. et al. Mussel-Inspired Electro-Cross-Linking of Enzymes for the Development of Biosensors. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 22, p. 18574–18584, 6 Jun. 2018.
 86. FATIMAH, I. et al. Mesoporous Silica-Based Catalysts for Biodiesel Production: A Review. **ChemEngineering**, v. 7, n. 3, p. 56, 2023.
 87. FENG, Q. et al. Electrospun regenerated cellulose nanofibrous membranes surface-grafted with polymer chains/brushes via the atom transfer radical polymerization method for catalase immobilization. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 6, n. 23, p. 20958–20967, 10 Dec. 2014.
 88. FERNANDES, R. A. et al. EDTA-Cu (II) chelating magnetic nanoparticles as a support for laccase immobilization. **Chemical Engineering Science**, v. 158, p. 599–605, 2017.
 89. FILIP, M. et al. Biocatalysts obtained by enzyme immobilization on functionalized mesoporous silica supports. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 61, n. 11–12, p. 927–933, 2016.
 90. FORNT-SUÑÉ, M. et al. Protein Nanoparticles for Targeted SARS-CoV-2 Trapping and Neutralization. **Advanced Healthcare Materials**, v. 14, n. 6, p. 2402744, 3 Mar. 2025.
 91. FRITEA, L. et al. Fluorescent and redox tetrazine films by host-guest immobilization of tetrazine derivatives within poly(pyrrole- β -cyclodextrin) films. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 781, p. 36–40, 2016.
 92. FRUNZA, L. et al. Oxidation activity of horseradish peroxidase hosted in molecular sieves: Spectroscopic investigations show hindering of the enzyme activity. **Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis**, v. 105, n. 1, p. 195–205, 2012.
 93. FUENTES, K. M. et al. Functionalized hierarchical wrinkled-silica spheres for laccases

- immobilization. **Journal of Porous Materials**, v. 28, n. 1, p. 261–269, 1 Feb. 2021.
94. GADDALE, P. et al. Recent progress in intensifying synthesis of acrylic microspheres for catalysis. Wiley Online Library. **Advanced Materials Interfaces**, v. 10, n. 13, 4 May 2023.
95. GAFFNEY, D.; COONEY, J.; MAGNER, E. Modification of mesoporous silicates for immobilization of enzymes. **Topics in Catalysis**, v. 55, n. 16–18, p. 1101–1106, Nov. 2012.
96. GALINDO, S. L. et al. Indirect Voltammetry Detection of Non-Electroactive Neurotransmitters Using Glassy Carbon Microelectrodes: The Case of Glutamate. **C-Journal of Carbon Research**, v. 10, n. 3, p. 68, 2024.
97. GAMA, R. S. et al. A novel functionalized SiO₂-based support prepared from biomass waste for lipase adsorption. **Materials Chemistry and Physics**, v. 234, p. 146–150, 2019.
98. GAN, J. S. et al. Covalent organic frameworks as emerging host platforms for enzyme immobilization and robust biocatalysis – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 167, p. 502–515, 2021.
99. GAO, B. et al. Modification of mesoporous material and stability of immobilization of penicillin G acylase. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 27, n. 10, p. 1823–1826, 2006.
100. GAO, N. et al. Lipase immobilized on MTMS-modified ceramic membrane for enhanced activity and stability. **Journal of Materials Science**, v. 58, n. 39, p. 15352–15366, 1 Oct. 2023.
101. GAO, R. et al. Design of an amperometric glucose oxidase biosensor with added protective and adhesion layers. **Microchimica Acta**, v. 188, n. 9, p. 312, 1 Sep. 2021.
102. GAO, Z. et al. Aldehydepropyl-functionalized mesostructured cellular foams: Efficient supports for immobilization of penicillin G acylase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 111–117, 2014.
103. GAO, Z. et al. Aldehyde-functionalized mesostructured cellular foams prepared by copolymerization method for immobilization of penicillin G acylase. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 202, n. C, p. 90–96, 2015.
104. GASCÓN, V. et al. Mesoporous silicas with tunable morphology for the immobilization of laccase. **Molecules**, v. 19, n. 6, p. 7057–7071, 2014.
105. GASCÓN, V.; MÁRQUEZ-ÁLVAREZ, C.; BLANCO, R. M. Efficient retention of laccase by non-covalent immobilization on amino-functionalized ordered mesoporous silica. **Applied Catalysis A: General**, v. 482, p. 116–126, 2014.
106. GASCÓN, V.; MÁRQUEZ-ÁLVAREZ, C.; BLANCO, R. M. Successful encapsulation

- of β -glucosidase during the synthesis of siliceous mesostructured materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 9, p. 2625–2634, 2018a.
107. GASCÓN, V.; MÁRQUEZ-ÁLVAREZ, C.; BLANCO, R. M. Successful encapsulation of β -glucosidase during the synthesis of siliceous mesostructured materials. Wiley Online Library. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 93, n. 9, p. 2625–2634, 1 Sep. 2018b.
108. GENTILI, D. et al. Integration of organic electrochemical transistors and immuno-affinity membranes for label-free detection of interleukin-6 in the physiological concentration range through antibody-antigen recognition. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 6, n. 33, p. 5400–5406, 2018.
109. GEORGE, R.; GOPINATH, S.; SUGUNAN, S. Improved stabilities of immobilized glucoamylase on functionalized mesoporous silica synthesized using decane as swelling agent. **Bulletin of Chemical Reaction Engineering and Catalysis**, v. 8, n. 1, p. 70–76, 2013.
110. GEORGELIN, T. et al. Functionalization of γ -Fe₂O₃ nanoparticles through the grafting of an organophosphorous ligand. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 134, n. 2, p. 451–454, 2008.
111. GHASEMITABESH, R. et al. Non-covalent and covalent binding of proteins on ultrananocrystalline diamond films with different surface terminations. **Diamond and Related Materials**, v. 156, p. 112432, 2025.
112. GHODSSI, R. et al. Integration of diverse biological materials in Micro/nano devices. **NATO Science for Peace and Security Series B: Physics and Biophysics**, p. 275–285, 2010.
113. GODDARD, J. M.; TALBERT, J. N.; HOTCHKISS, J. H. Covalent attachment of lactase to low-density polyethylene films. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 1, p. E036–E041, 2007.
114. GOHARRIZI, F. S. et al. Enhanced stability and activity of diaphorase enzyme immobilized on magnetic mesoporous silica. **Journal of Porous Materials**, v. 32, n. 4, p. 1607–1625, 1 Aug. 2025.
115. GOMEZ-MALDONADO, D. et al. Simple functionalization of cellulose beads with pre-propargylated chitosan for clickable scaffold substrates. **Cellulose**, v. 28, n. 10, p. 6073–6087, 1 Jul. 2021.
116. GREIFENSTEIN, R. et al. MOF-Hosted Enzymes for Continuous Flow Catalysis in Aqueous and Organic Solvents. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 61, n.

- 18, p. e202117144, 25 Apr. 2022.
117. GUPTA, M. N. et al. Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology**, v. 39, n. 2, p. 98–109, Apr. 2011.
 118. HAN, P. et al. Conferring Natural-Derived Porous Microspheres with Surface Multifunctionality through Facile Coordination-Enabled Self-Assembly Process. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 12, p. 8076–8085, 30 Mar. 2016.
 119. HE, J.; LIU, Z.; HAI, C. Adsorption heterogeneity of lysozyme over functionalized mesoporous silica: Effect of interfacial noncovalent interactions. **AIChE Journal**, v. 54, n. 9, p. 2495–2506, Sep. 2008.
 120. HEID, S. et al. Synthesis and characterization of tissue plasminogen activator—functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeted fibrin clot dissolution. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1837, 2017.
 121. HEIKKINEN, J. J. et al. Covalent biofunctionalization of cellulose acetate with thermostable chimeric avidin. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 7, p. 2240–2245, 27 Jul. 2011.
 122. HOFFMANN, C. et al. Surface modification of polysulfone membranes applied for a membrane reactor with immobilized alcohol dehydrogenase. **Materials Today Communications**, v. 14, p. 160–168, 2018.
 123. HOLZINGER, M.; COSNIER, S.; BUZZETTI, P. H. M. The versatility of pyrene and its derivatives on sp² carbon nanomaterials for bioelectrochemical applications. **Synthetic Metals**, v. 292, p. 117219, 2023.
 124. HOOG ANTINK, M. M. et al. Proteolytic ceramic capillary membranes for the production of peptides under flow. **Biochemical Engineering Journal**, v. 147, p. 89–99, 2019.
 125. HORN, C. et al. Chemical Design of Hydrogels with Immobilized Laccase for the Reduction of Persistent Trace Compounds in Wastewater. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 3, n. 5, p. 2823–2834, 14 May 2021.
 126. HOU, J. et al. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 452, p. 229–240, 2014.
 127. HUDSON, S. et al. Chloroperoxidase on periodic mesoporous organosilanes: Immobilization and reuse. **Chemistry of Materials**, v. 19, n. 8, p. 2049–2055, 17 Apr. 2007.
 128. HUDSON, S.; COONEY, J.; MAGNER, E. Proteins in mesoporous silicates. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 47, n. 45, p. 8582–8594, 27 Oct. 2008.

129. HY, L. G. et al. **Comparative study on functionalized SBA-15 and SBA-16 nanostructured materials used for immobilization of D-amino acid oxidase.** Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering IV and Complex Systems. **Anais...**2008. Disponível em: <https://www.spiedigitallibrary.org/conference-proceedings-of-spie/7270/727017/Comparative-study-on-functionalized-SBA-15-and-SBA-16-nanostructured/10.1117/12.810706.short>. Acesso em: 20 set. 2025.
130. IAFISCO, M. et al. Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate. **Langmuir**, v. 24, n. 9, p. 4924–4930, 6 May 2008.
131. IBÁÑEZ-REDÍN, G. et al. Effect of carbon black functionalization on the analytical performance of a tyrosinase biosensor based on glassy carbon electrode modified with dihexadecylphosphate film. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 116, p. 41–47, 2018.
132. IBRAR, M.; ZHANG, H. Site-Specific Biofunctionalization of Cellulose and Poly(dimethylsiloxane): A Chemoenzymatic Approach for Surface Engineering. **Langmuir**, v. 36, n. 49, p. 15039–15047, 15 Dec. 2020.
133. JAMIE, A. et al. Immobilization and enhanced catalytic activity of lipase on modified MWCNT for oily wastewater treatment. **Environmental Progress and Sustainable Energy**, v. 35, n. 5, p. 1441–1449, 1 Sep. 2016.
134. JANG, S. et al. Trypsin immobilization on mesoporous silica with or without thiol functionalization. **Journal of Porous Materials**, v. 13, n. 3, p. 385–391, Aug. 2006.
135. JANKOWSKA, K. et al. Laccase immobilized onto zirconia-silica hybrid doped with Cu²⁺ as an effective biocatalytic system for decolorization of dyes. **Materials**, v. 12, n. 8, p. 1252, 2019.
136. JARA FORNEROD, M. J. et al. Glucose Oxidase Loading in Ordered Porous Aluminosilicates: Exploring the Potential of Surface Modification for Electrochemical Glucose Sensing. **Chemistry of Materials**, v. 35, n. 18, p. 7577–7587, 26 Sep. 2023.
137. JASWAL, N. et al. ORMOSIL: advanced catalytic application in organic synthesis. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 22, n. 5, p. 931–953, 1 May 2025.
138. JĘDRZAK, A. et al. Polydopamine grafted on an advanced Fe₃O₄/lignin hybrid material and its evaluation in biosensing. **Applied Surface Science**, v. 455, p. 455–464, 2018.
139. JEENPADIPHAT, S. et al. Propylsulfonic acid functionalized mesoporous silica catalysts for esterification of fatty acids. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 410, p. 253–259, 2015.

140. JIA, H. Enzyme-Carrying Electrospun Nanofibers. **Methods in Molecular Biology**, v. 743, p. 205–212, 2011.
141. JIN, D. et al. The selective immobilization of curcumin onto the internal surface of mesoporous hollow silica particles by covalent bonding and its controlled release. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 11, p. 3641–3645, 2011.
142. JUNG, D.; HARTMANN, M. **Oxidation of indole with CPO and GOx immobilized on mesoporous molecular sieves**. Catalysis Today. **Anais...**2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167299108800675>. Acesso em: 20 set. 2025.
143. JUNG, D.; STREB, C.; HARTMANN, M. Covalent anchoring of chloroperoxidase and glucose oxidase on the mesoporous Molecular Sieve SBA-15. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, n. 2, p. 762–778, 2010.
144. KAMBLE, M.; SALVI, H.; YADAV, G. D. Preparation of amino-functionalized silica supports for immobilization of epoxide hydrolase and cutinase: characterization and applications. **Journal of Porous Materials**, v. 27, n. 5, p. 1559–1567, 1 Oct. 2020.
145. KANDEL, K. et al. **Supported hybrid enzyme-organocatalysts for upgrading the carbon content of alcohols**. ACS Symposium Series. **Anais...**American Chemical Society, 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-2013-1132.ch011>>. Acesso em: 20 sep. 2025
146. KANNAN, K.; JASRA, R. V. Immobilization of alkaline serine endopeptidase from *Bacillus licheniformis* on SBA-15 and MCF by surface covalent binding. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 56, n. 1, p. 34–40, 2009.
147. KAO, K. C.; LIN, T. S.; MOU, C. Y. Enhanced activity and stability of lysozyme by immobilization in the matching nanochannels of mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 13, p. 6734–6743, 3 Apr. 2014.
148. KARIMI, Z.; MAHJOUR, A. R. Efficient epoxidation over cyanocobalamine containing SBA-15 organic-inorganic nanohybrids. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 14, p. 4473–4479, 2010a.
149. KARIMI, Z.; MAHJOUR, A. R. Efficient epoxidation over cyanocobalamine containing SBA-15 organic-inorganic nanohybrids. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 14, p. 4473–4479, 2010b.
150. KARIMI, Z.; MAHJOUR, A. R. Efficient epoxidation over cyanocobalamine containing SBA-15 organic-inorganic nanohybrids. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 14, p. 4473–4479, 23 Jan. 2010c.

151. KARIMI, Z.; SCIENCE, A. M.-A. SURFACE; 2010, U. Efficient epoxidation over cyanocobalamine containing SBA-15 organic–inorganic nanohybrids. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 14, p. 4473–4479, 2010.
152. KAUR, G.; TAGGAR, M. S.; KALIA, A. Cellulase-immobilized chitosan-coated magnetic nanoparticles for saccharification of lignocellulosic biomass. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 52, p. 111627–111647, 1 Nov. 2023.
153. KHANMOHAMMADI, F. et al. SBA-15 with short channels for laccase immobilization. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 309, p. 110527, 2020.
154. KHIZAR, S. et al. Magnetic Nanoparticles: From Synthesis to Theranostic Applications. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 5, p. 4284–4306, 28 May 2021.
155. KIM, H. et al. Urease adsorption immobilization on ionic liquid-like macroporous polymeric support. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 24, p. 14884–14896, 1 Dec. 2019.
156. KIMMINS, S. D.; WYMAN, P.; CAMERON, N. R. Amine-functionalization of glycidyl methacrylate-containing emulsion-templated porous polymers and immobilization of proteinase K for biocatalysis. **Polymer**, v. 55, n. 1, p. 416–425, 2014.
157. KOEV, S. T. et al. Chitosan: an integrative biomaterial for lab-on-a-chip devices. **Lab on a Chip**, v. 10, p. 3026–3042, 2010.
158. KOUSIK, S. R. et al. Imaging the Permeability and Passivation Susceptibility of SiO₂Nanosphere-Based Mesoporous Supports for Molecular Heterogeneous Catalysis under Confinement. **ACS Applied Nano Materials**, v. 5, n. 10, p. 14733–14745, 28 Oct. 2022.
159. KUMAR-KRISHNAN, S. et al. Surface functionalized halloysite nanotubes decorated with silver nanoparticles for enzyme immobilization and biosensing. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 15, p. 2553–2560, 2016.
160. KUMAR-KRISHNAN, S. et al. Synthesis of gold nanoparticles supported on functionalized nanosilica using deep eutectic solvent for an electrochemical enzymatic glucose biosensor. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 34, p. 7072–7081, 2017.
161. KUMARI, S. et al. Functionalization of SBA-15 mesoporous materials using “thiol-ene click” Michael addition reaction. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 115, n. 36, p. 17774–17781, 15 Sep. 2011.
162. LABUS, K.; GANCARZ, I.; BRYJAK, J. Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamide membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 2, p. 228–235, 2012a.

163. LABUS, K.; GANCARZ, I.; BRYJAK, J. Immobilization of laccase and tyrosinase on untreated and plasma-treated cellulosic and polyamide membranes. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, n. 2, p. 228–235, 2012b.
164. LAI, Y. R. et al. Silver nanoparticle-deposited whey protein isolate amyloid fibrils as catalysts for the reduction of methylene blue. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 213, p. 1098–1114, 2022.
165. LAN, J. N. et al. Immobilization of laccase on epoxy group-functionalized periodic mesoporous organosilicas. **Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 31, n. 8, p. 1579–1584, 2010.
166. LASMI, K. et al. Tyrosinase immobilization on functionalized porous silicon surface for optical monitoring of pyrocatechol. **Applied Surface Science**, v. 446, p. 3–9, 2018.
167. LAU, K. et al. Dry surface treatments of silk biomaterials and their utility in biomedical applications. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 6, n. 10, p. 5431–5452, 12 Oct. 2020.
168. LE, H. G. et al. Immobilization of lipase and keratinase on functionalized SBA-15 nanostructured materials. **Micro/Nano Materials, Devices, and Systems**, v. 8923, p. 554–562, 2013.
169. LECHNER, C. C.; BECKER, C. F. W. Silaffins in silica biomineralization and biomimetic silica precipitation. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5297–5333, 2015.
170. LEDESMA-GARCÍA, J. et al. Development of bioanode for versatile applications: microfuel cell system in the presence of alcohol and glucose. **Materials for Renewable and Sustainable Energy**, v. 11, n. 3, p. 155–167, 1 Dec. 2022.
171. LENARDA, A. et al. Selective Functionalization Blended with Scaffold Conductivity in Graphene Acid Promotes H₂O₂ Electrochemical Sensing. **ACS Omega**, v. 4, n. 22, p. 19944–19952, 26 Nov. 2019.
172. LI, Y. et al. Conformable self-assembling amyloid protein coatings with genetically programmable functionality. **Science Advances**, v. 6, n. 21, p. eaba1425, 1 May 2020.
173. LIU, J. et al. Magnetic silica spheres with large nanopores for nucleic acid adsorption and cellular uptake. **Biomaterials**, v. 33, n. 3, p. 970–978, 2012.
174. LIU, L.; YU, J.; CHEN, X. Enhanced stability and reusability of alcohol dehydrogenase covalently immobilized on magnetic graphene oxide nanocomposites. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 2, p. 1213–1220, 2015.
175. LIU, Q.; SUN, N.; DENG, C. HUI. Recent advances in metal-organic frameworks for separation and enrichment in proteomics analysis. **TrAC - Trends in Analytical**

- Chemistry**, v. 110, p. 66–80, 2019.
176. LÜ, Y. et al. Functionalization of cubic Ia3d mesoporous silica for immobilization of penicillin G acylase. **Advanced Functional Materials**, v. 17, n. 13, p. 2160–2166, 3 Sep. 2007.
 177. MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213–6222, 2013.
 178. MAHONEY, K. W.; TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Effect of polyethylene glycol tether size and chemistry on the attachment of lactase to polyethylene films. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 2, p. 1203–1210, 15 Jan. 2013.
 179. MALAIBARI, Z. O. Effect of MWCNTs surface properties on lipase immobilization and its catalytic activity. **Materials Express**, v. 8, n. 2, p. 123–132, 2018.
 180. MANSUR, H. S. et al. Biomaterial with chemically engineered surface for protein immobilization. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 16, n. 4, p. 333–340, Apr. 2005.
 181. MARTINS DE OLIVEIRA, S. et al. Functionalization of Porous Cellulose with Glyoxyl Groups as a Carrier for Enzyme Immobilization and Stabilization. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 2, p. 927–937, 8 Feb. 2021.
 182. MASDEU, G. et al. Hybrid chloroperoxidase-magnetic nanoparticle clusters: effect of functionalization on biocatalyst performance. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 233–245, 1 Jan. 2018.
 183. MASUDA, Y. et al. Enhancement of activity and stability of the formaldehyde dehydrogenase by immobilizing onto phenyl-functionalized mesoporous silica. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 26–33, 2013.
 184. MATVEEVA, V. et al. Magnetically separable biocatalyst of D-glucose oxidation. **AIP Conference Proceedings**, v. 2022, n. 1, p. 020008, 2018.
 185. MATVEEVA, V. G.; BRONSTEIN, L. M. Magnetic nanoparticle-containing supports as carriers of immobilized enzymes: Key factors influencing the biocatalyst performance. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 2257, 2021.
 186. MAYORAL, A. et al. Designing Functionalized Mesoporous Materials for Enzyme Immobilization: Locating Enzymes by Using Advanced TEM Techniques. **ChemCatChem**, v. 5, n. 4, p. 903–909, Apr. 2013.
 187. MAZZEI, F. et al. Electron-transfer kinetics of microperoxidase-11 covalently immobilised onto the surface of multi-walled carbon nanotubes by reactive landing of mass-selected ions. **Chemistry - A European Journal**, v. 15, n. 30, p. 7359–7367, 27 Jul.

- 2009.
188. MEDDA, L. et al. Adsorption of lysozyme on hyaluronic acid functionalized SBA-15 mesoporous silica: A possible bioadhesive depot system. **Langmuir**, v. 30, n. 43, p. 12996–13004, 4 Nov. 2014.
 189. MEDINA-CASTILLO, A. L. et al. Hydrophilic Nonwoven Nanofiber Membranes as Nanostructured Supports for Enzyme Immobilization. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 4, n. 8, p. 6054–6066, 12 Aug. 2022.
 190. MEHDE, A. A. et al. Lipase-based on starch material as a development matrix with magnetite cross-linked enzyme aggregates and its application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1533–1543, 2018.
 191. MEHDIPOUR-ATAEI, S.; CATALYSTS, E. A.-; 2022, U. Mesoporous carbon-based materials: A review of synthesis, modification, and applications. **Catalysts**, v. 13, n. 1, p. 2, 2022.
 192. MEISSNER, J. et al. Protein immobilization in surface-functionalized SBA-15: Predicting the uptake capacity from the pore structure. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 119, n. 5, p. 2438–2446, 5 Feb. 2015.
 193. MERKER, D. et al. Nanostructured modified ultrananocrystalline diamond surfaces as immobilization support for lipases. **Diamond and Related Materials**, v. 90, p. 32–39, 2018.
 194. MILLS, R. et al. Aerosol capture and coronavirus spike protein deactivation by enzyme functionalized antiviral membranes. **Communications Materials**, v. 3, n. 1, p. 34, 2022.
 195. MILOVANOVIĆ, J. et al. The Organic-Functionalized Silica Nanoparticles as Lipase Carriers for Biocatalytic Application: Future Perspective in Biodegradation. **Catalysts**, v. 15, n. 1, p. 54, 2025.
 196. MIN, K. et al. Enzyme immobilization on carbon nanomaterials: Loading density investigation and zeta potential analysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 87–93, 2012.
 197. MINETT, A. I. et al. Decoration of carbon nanotubes with biological entities for electronic device applications. **International Conference on Nanoscience and Nanotechnology**, p. 290–293, 2006.
 198. MISHRA, S. D. et al. Amphoteric Cross-Linked Cellulose Nanoparticles as a Platform for Immobilization of Proteins and Cells, Enabling Bioanalyte Sensing. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 17, n. 5, p. 7262–7274, 5 Feb. 2025.
 199. MITCHELL, S.; BONILLA, A.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Preparation of organic-

- functionalized mesoporous ZSM-5 zeolites by consecutive desilication and silanization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 127, n. 1–2, p. 278–284, 2011a.
200. MITCHELL, S.; BONILLA, A.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Preparation of organic-functionalized mesoporous ZSM-5 zeolites by consecutive desilication and silanization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 127, n. 1–2, p. 278–284, 2011b.
201. MITCHELL, S.; BONILLA, A.; PÉREZ-RAMÍREZ, J. Preparation of organic-functionalized mesoporous ZSM-5 zeolites by consecutive desilication and silanization. **Materials Chemistry and Physics**, v. 127, n. 1–2, p. 278–284, 6 Jun. 2011c.
202. MONTEIL, C. et al. Partially phosphonated polyethylenimine-coated nanoparticles as convenient support for enzyme immobilization in bioprocessing. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 192, p. 269–274, 2014.
203. MORSHED, M. N. et al. An overview on biocatalysts immobilization on textiles: Preparation, progress and application in wastewater treatment. **Chemosphere**, v. 279, p. 130481, 2021.
204. MUKHEJA, Y. et al. Lignin: The green powerhouse for enzyme immobilization in biocatalysis and biosensing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 280, p. 135940, 2024.
205. MÜLLER, B. M. et al. Surface modification of copolymerized films from three-armed biodegradable macromers – An analytical platform for modified tissue engineering scaffolds. **Acta Biomaterialia**, v. 51, p. 148–160, 2017.
206. MUÑOZ-PINA, S. et al. Influence of the functionalisation of mesoporous silica material UVM-7 on polyphenol oxidase enzyme capture and enzymatic browning. **Food Chemistry**, v. 310, p. 125741, 2020.
207. MUREŞEANU, M. et al. Cu(II) complexes imobilized on functionalized mesoporous silica as catalysts for biomimetic oxidations. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 24, p. 6795–6804, 2009.
208. NA, W. et al. Effective immobilization of enzyme in glycidoxypopyl-functionalized periodic mesoporous organosilicas (PMOs). **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 134, n. 1–3, p. 72–78, 2010.
209. NAGARAJU, K.; REDDY, R.; REDDY, N. A review on protein functionalized carbon nanotubes. **Journal of Applied Biomaterials & Functional Materials**, v. 13, n. 4, p. e301–e312, 2015.
210. NAGHDI, M. et al. Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. **Science of The Total**

- Environment**, v. 584, p. 393–401, 2017.
211. NARGANG, T. M. et al. Functionalization of paper using photobleaching: A fast and convenient method for creating paper-based assays with colorimetric and fluorescent readout. **Engineering in Life Sciences**, v. 16, n. 6, p. 525–531, 1 Sep. 2016.
 212. NATHANI, A.; VISHNU, N.; SHARMA, C. S. Review—Pencil Graphite Electrodes as Platform for Enzyme and Enzyme-Like Protein Immobilization for Electrochemical Detection. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037520, 2 Jan. 2020.
 213. NAVAEE, A.; SALIMI, A. Graphene-supported pyrene-functionalized amino-carbon nanotube: A novel hybrid architecture of laccase immobilization as effective bioelectrocatalyst for oxygen reduction reaction. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 14, p. 7623–7630, 2015.
 214. NENNINGER, C. et al. Surface-confined enzymatic method for scalable thin film generation. **Surfaces and Interfaces**, v. 60, p. 106046, 2025.
 215. NICOLAU, E. et al. Bioelectrochemistry of non-covalent immobilized alcohol dehydrogenase on oxidized diamond nanoparticles. **Bioelectrochemistry**, v. 85, p. 1–6, 2012.
 216. NICULESCU, V. C.; PAUN, G.; PARVULESCU, V. New organometallic complex supported on mesoporous silica and its enzymes activity inhibition properties. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, n. 12, p. e4590, 1 Dec. 2018.
 217. NOREEN, S. et al. Laccase-loaded functionalized graphene oxide assemblies with improved biocatalytic properties and decolorization performance. **Environmental Technology and Innovation**, v. 24, p. 101884, 2021.
 218. NUNES, S. C. et al. Resin Supported Acyl Carrier Protein Labeling Strategies. **RSC Advances**, v. 4, n. 18, p. 9092–9097, 2014.
 219. OMIDINIA, E.; SHADJOU, N.; HASANZADEH, M. (Fe₃O₄)-graphene oxide as a novel magnetic nanomaterial for non-enzymatic determination of phenylalanine. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 8, p. 4624–4632, 2013.
 220. PADHI, S. S. P. et al. Role of Surface Enhancement in the Enzymatic Cross-Linking of Lignosulfonate Using Alternative Downstream Techniques. **ACS Omega**, v. 7, n. 27, p. 23749–23758, 12 Jul. 2022.
 221. PALIVAN, C. G.; ZHANG, X.; MEIER, W. Protein-polymer supramolecular assemblies: A key combination for multifunctionality. **Chimia**, v. 67, n. 11, p. 791–795, 2013.
 222. PARVULESCU, V. et al. Effect of polymer support functionalization on enzyme immobilization and catalytic activity. **Pure and Applied Chemistry**, v. 86, n. 11, p. 1793–

- 1803, 1 Nov. 2014.
223. PATEL, V. et al. Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Candida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: Process parameters and reusability studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, p. 62–70, 2015.
 224. PATIL, N. A.; KANDASUBRAMANIAN, B. Functionalized polylysine biomaterials for advanced medical applications: A review. **European Polymer Journal**, v. 146, p. 110248, 2021.
 225. PÉREZ-GUZMÁN, A. K. et al. Chitosan-heparin functionalised magnetic nanoparticles for the magnetic recovery of *Aspergillus Niger* lipase enzyme. **Micro and Nano Letters**, v. 14, n. 6, p. 623–628, 2019.
 226. PETERSEN, S. et al. Site-selective immobilization of anti-CD34 antibodies to poly(l - lactide) for endovascular implant surfaces. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 102, n. 2, p. 345–355, Feb. 2014.
 227. PIETRICOLA, G. et al. Covalent Immobilization of Aldehyde and Alcohol Dehydrogenases on Ordered Mesoporous Silicas. **Waste and Biomass Valorization**, v. 13, n. 9, p. 4043–4055, 1 Sep. 2022.
 228. PINTO BRITO, M. J. et al. Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 309, p. 110576, 2020.
 229. PREETHI, K. et al. Recent advancements in the fabrication and properties of tailored COFs for catalytic theranostic processes, energy storage and environmental sustainability. **Catalysis Science and Technology**, v. 15, p. 4085, 2025.
 230. PUENTES-CAMACHO, D. et al. Functionalization of multiwalled carbon nanotubes by microwave irradiation for lysozyme attachment: Comparison of covalent and adsorption methods by kinetics of thermal inactivation. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, n. 4, 2017.
 231. PUNDIR, M. et al. Enzyme modified CNTs for biosensing application: Opportunities and challenges. **Colloids and Interface Science Communications**, v. 44, p. 100506, 2021.
 232. QI, H. et al. Functionalization of single-walled carbon nanotubes with protein by click chemistry as sensing platform for sensitized electrochemical immunoassay. **Electrochimica Acta**, v. 63, p. 76–82, 2012.
 233. QIAN, J. et al. Immobilization of lipase on silica nanoparticles by adsorption followed by glutaraldehyde cross-linking. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 46, n. 1, p. 25–38, 1 Jan. 2023.

234. QUARTINELLO, F. et al. Smart textiles in wound care: Functionalization of cotton/PET blends with antimicrobial nanocapsules. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 42, p. 6592–6603, 2019.
235. RANJAN, B. et al. Simultaneous removal of heavy metals and cyanate in a wastewater sample using immobilized cyanate hydratase on magnetic-multiwall carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 363, p. 73–80, 2019.
236. RASHID, S. S. et al. Magnetic nickel nanostructure as cellulase immobilization surface for the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 209, p. 1048–1053, 2022.
237. REZAEI, A. et al. Ugi Four-Component Assembly Process: An Efficient Approach for One-Pot Multifunctionalization of Nanographene Oxide in Water and Its Application in Lipase Immobilization. **Chemistry of Materials**, v. 28, n. 9, p. 3004–3016, 10 May 2016.
238. REZVANI, M. et al. Amperometric biosensor for detection of triglyceride tributyrin based on zero point charge of activated carbon. **Turkish Journal of Biology**, v. 41, n. 2, p. 268–277, 2017.
239. RIBEIRO, L. M. O. et al. Immobilization of the enzyme invertase in SBA-15 with surfaces functionalized by different organic compounds. **Journal of Porous Materials**, v. 26, n. 1, p. 77–89, 15 Feb. 2019.
240. RICCÒ, R. et al. Metal–organic frameworks for cell and virus biology: a perspective. **ACS Nano**, v. 12, n. 1, p. 13–23, 23 Jan. 2018.
241. RIEDL, V. et al. Detection of Sulfonamide Antibiotics Using an Elastic Hydrogel Microparticles-Based Optical Biosensor. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 16, n. 38, p. 50202–50211, 25 Sep. 2024.
242. ROBERTS, A. D. et al. Enzyme immobilisation on wood-derived cellulose scaffoldsviacarbohydrate-binding module fusion constructs. **Green Chemistry**, v. 23, n. 13, p. 4716–4732, 2021.
243. ROMERO-ARCOS, M. et al. Synthesis and functionalization of carbon nanotubes and nanospheres as a support for the immobilization of an enzyme extract from the mushroom *Trametes versicolor*. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 17, p. 11671–11681, 15 Sep. 2019.
244. RÜBSAM, K. et al. KnowVolution of the polymer-binding peptide LCI for improved polypropylene binding. **Polymers**, v. 10, n. 4, p. 423, 2018.
245. SALIS, A. et al. Physical and Chemical Lipase Adsorption on SBA-15: Effect of Different Interactions on Enzyme Loading and Catalytic Performance. **ChemCatChem**, v.

- 2, n. 3, p. 322–329, 8 Mar. 2010.
246. SAMUI, A. et al. Fabrication of a magnetic nanoparticle embedded NH₂-MIL-88B MOF hybrid for highly efficient covalent immobilization of lipase. **RSC Advances**, v. 6, n. 71, p. 66385–66393, 2016.
247. SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, A. et al. Synthesization, characterization, and in vitro evaluation of cytotoxicity of biomaterials based on halloysite nanotubes. **Materials**, v. 7, n. 12, p. 7770–7780, 2014.
248. SANDU, T. et al. Functionalized bicomponent polymer membranes as supports for covalent immobilization of enzymes. **Reactive and Functional Polymers**, v. 96, p. 5–13, 2015.
249. SANTOS, M. et al. Development of a sugar-based polyurethane foam colorimetric sensor for E. coli detection. **Materials Today Chemistry**, v. 40, p. 102193, 2024.
250. SANTOS, M. P. F. et al. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1982–1990, 2019a.
251. SANTOS, M. P. F. et al. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1982–1990, 2019b.
252. SANTOS, M. P. F. et al. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1982–1990, 2019c.
253. SANTOS, M. P. F. et al. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding, and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 6, p. 1982–1990, 1 Jun. 2019d.
254. SAVIN, R. et al. Nanohybrid biosensor based on mussel-inspired electro-cross-linking of tannic acid capped gold nanoparticles and enzymes. **Materials Advances**, v. 3, n. 4, p. 2222–2233, 2022.
255. SCHMIDT, M. et al. Radiation-induced graft immobilization (Rigi): Covalent binding of non-vinyl compounds on polymer membranes. **Polymers**, v. 13, n. 11, 2021.
256. SCUTO, F. R. et al. Design of a 3D Amino-Functionalized Rice Husk Ash Nano-Silica/Chitosan/Alginate Composite as Support for Laccase Immobilization. **Polymers**, v. 15, n. 14, p. 3127, 2023.
257. SERHAN, M. et al. **Total iron measurement in human serum with a smartphone.** AIChE Annual Meeting, Conference Proceedings. **Anais...**2019a. Disponível em:

- <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/tb/c4tb00018h>. Acesso em: 20 set. 2025
258. SERHAN, M. et al. **Total iron measurement in human serum with a smartphone**. AICHe Annual Meeting, Conference Proceedings. **Anais...**2019b. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2014/tb/c3tb21846e>. Acesso em: 20 set. 2025
259. SERRA, E. et al. Immobilization of lipase in ordered mesoporous materials: Effect of textural and structural parameters. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 114, n. 1–3, p. 201–213, 2008.
260. SHAABANI, A. et al. The status of isocyanide-based multi-component reactions in Iran (2010–2018). **Springer**, v. 25, n. 2, p. 1145–1210, 1 May 2021.
261. SHARIFUZZAMAN, M. et al. MXene/Fluoropolymer-Derived Laser-Carbonaceous All-Fibrous Nanohybrid Patch for Soft Wearable Bioelectronics. **Advanced Functional Materials**, v. 33, n. 21, p. 2370131, 17 May 2023.
262. SHEN, F. et al. Two-dimensional graphene paper supported flexible enzymatic fuel cells. **Nanoscale Advances**, v. 1, n. 7, p. 2562–2570, 2019.
263. SILLU, D.; AGNIHOTRI, S. Cellulase Immobilization onto Magnetic Halloysite Nanotubes: Enhanced Enzyme Activity and Stability with High Cellulose Saccharification. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 8, n. 2, p. 900–913, 21 Jan. 2020.
264. SOARES, R. M. D. et al. Electrospinning and electrospray of bio-based and natural polymers for biomaterials development. **Materials Science and Engineering C**, 2018. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493117343394?casa_token=G_zj_GDNa0kAAAAA:ENZsapbzA8oqPkphTC2_1HF7zUucLsJP6KqOyj3cVL1Z-BW5FHcuCQU9PttvURUCNxDSHxjsEA. Acesso em: 20 set. 2025
265. SOLA-RABADA, A. et al. Biogenic porous silica and silicon sourced from Mexican Giant Horsetail (*Equisetum myriochaetum*) and their application as supports for enzyme immobilization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 166, p. 195–202, 2018.
266. SOLTANI FIROOZ, N. et al. Direct introduction of amine groups into cellulosic paper for covalent immobilization of tyrosinase: support characterization and enzyme properties. **Cellulose**, v. 24, n. 3, p. 1407–1416, 1 Mar. 2017.
267. SONG, Y.; CHEN, C.; WANG, C. Graphene/enzyme-encrusted three-dimensional carbon micropillar arrays for mediatorless micro-biofuel cells. **Nanoscale**, v. 7, n. 16, p. 7084–7090, 2015.
268. SOTO, I. D.; ESCOBAR, S.; MESA, M. Study of the physicochemical interactions between *Thermomyces lanuginosus* lipase and silica-based supports and their correlation

- with the biochemical activity of the biocatalysts. **Materials Science and Engineering C**, v. 79, p. 525–532, 2017.
269. SOUSA, A. M. L. et al. Highly Active Protein Surfaces Enabled by Plant-Based Polyphenol Coatings. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 45, p. 39353–39362, 14 Nov. 2018.
270. SOUZA JÚNIOR, E. C. et al. Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1146, p. 122124, 2020a.
271. SOUZA JÚNIOR, E. C. et al. Hydrolysis of casein from different sources by immobilized trypsin on biochar: Effect of immobilization method. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1146, n. 2, p. 157–161, Apr. 2020b.
272. STANZIONE, I. et al. Innovative surface bio-functionalization by fungal hydrophobins and their engineered variants. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 9, p. 959166, 11 Aug. 2022.
273. STOJKOVIČ, G. et al. Surface cell immobilization within perfluoroalkoxy microchannels. **Applied Surface Science**, v. 320, p. 810–817, 2014.
274. STURALA, J. et al. Thiographene synthesized from fluorographene: Via xanthogenate with immobilized enzymes for environmental remediation. **Nanoscale**, v. 11, n. 22, p. 10695–10701, 2019.
275. SU, C. K. Review of 3D-Printed functionalized devices for chemical and biochemical analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 1158, p. 338348, 2021.
276. ŠULEK, F. et al. Surface functionalization of silica-coated magnetic nanoparticles for covalent attachment of cholesterol oxidase. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 2, p. 179–185, 2010.
277. SUN, X. et al. Functionalized acetoacetylated poly(vinyl alcohol) monoliths for enzyme immobilization: a phase separation method. **Colloid and Polymer Science**, v. 295, n. 10, p. 1827–1833, 1 Oct. 2017.
278. T.SRIWONG, K.; MATSUDA, T. Recent Advances in Enzyme Immobilization Utilizing Nanotechnology for Biocatalysis. Organic Process Research and Development. **American Chemical Society**, v.26, n. 7, 15 Jul. 2022. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.oprd.1c00404>. Acesso em: 21 set. 2025
279. TAHMASBI, L. et al. Mesoporous silica nanoparticles supported copper(II) and

- nickel(II) Schiff base complexes: Synthesis, characterization, antibacterial activity and enzyme immobilization. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 258, p. 517–525, 2018.
280. TARPANI, L. et al. New Insights into the Effects of Surface Functionalization on the Peroxidase Activity of Cytochrome c Adsorbed on Silica Nanoparticles. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 123, n. 11, p. 2567–2575, 21 Mar. 2019.
281. TERYTYEVA, T. G. et al. Bioactive flake-shell capsules: Soft silica nanoparticles for efficient enzyme immobilization. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 26, p. 3248–3256, 2013.
282. TOPOLNIAK, I. et al. High-Precision Micropatterning of Polydopamine by Multiphoton Lithography. **Advanced Materials**, v. 34, n. 18, p. 2109509, 1 May 2022.
283. TRIVEDI, P. et al. Synthesis of novel zwitterionic cellulose beads by oxidation and coupling chemistry in water. **Cellulose**, v. 23, n. 3, p. 1751–1761, 1 Jun. 2016.
284. TU, J. et al. Mesoporous Silica Nanoparticles with Large Pores for the Encapsulation and Release of Proteins. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 47, p. 32211–32219, 30 Nov. 2016.
285. ULU, A. et al. The Carboxylated Multi-walled Carbon Nanotubes/l-Asparaginase Doped Calcium-Alginate Beads: Structural and Biocatalytic Characterization. **Catalysis Letters**, v. 150, n. 6, p. 1679–1691, 1 Jun. 2020.
286. VASIĆ, K. et al. Epoxy functionalized carboxymethyl dextran magnetic nanoparticles for immobilization of alcohol dehydrogenase. **Acta Chimica Slovenica**, v. 67, n. 4, p. 1172–1179, 2020.
287. VEGA ERRAMUSPE, I. B. et al. Advanced Cellulose Fibers for Efficient Immobilization of Enzymes. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 10, p. 3188–3197, 10 Oct. 2016.
288. VERMA, M. L.; PURI, M.; BARROW, C. J. Recent trends in nanomaterials immobilised enzymes for biofuel production. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 108–119, 2 Jan. 2016.
289. VERMA, R. et al. Fabrication of a mesoporous CoFe₂O₄/rGO nanohybrid and laccase interface biosensor for rapid detection of adrenaline for neurodegenerative disease diagnosis. **Materials Advances**, v. 6, n. 6, p. 1988–2001, 2025.
290. VERNÉ, E. et al. Alkaline phosphatase grafting on bioactive glasses and glass ceramics. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 1, p. 229–240, 2010.
291. VIEIRA, Y. A. et al. A Perspective Review on the Application of Polyacrylonitrile-Based Supports for Laccase Immobilization. **Chemical Record**, v. 22, n. 2, p. e202100215, 1

- Feb. 2022.
292. VITOLA, G. et al. PVDF membrane biofunctionalization by chemical grafting. **Journal of Membrane Science**, v. 476, p. 483–489, 2015.
 293. VUTTI, S. et al. Click Chemistry Mediated Functionalization of Vertical Nanowires for Biological Applications. **Chemistry - A European Journal**, v. 22, n. 2, p. 496–500, 11 Jan. 2016.
 294. WALCARIUS, A. et al. Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: Recent trends. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 38, p. 4878–4908, 2013.
 295. WANG, B. et al. Efficient resolution of 3-phenoxy-1,2-propanediol by immobilized lipase on amphiphilic comb polymer modified TiO₂. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 106, p. 105–110, 2014a.
 296. WANG, H. et al. Modification of silica xerogels with polydopamine for lipase b from candida antarctica immobilization. **Catalysts**, v. 11, n. 12, p. 1463, 2021.
 297. WANG, H.; ADVANCES, A. B.-M.; 2023, U. Covalent conjugation of proteins onto fluorescent single-walled carbon nanotubes for biological and medical applications. **Materials Advances**, v. 4, p. 823, 2023.
 298. WANG, J. et al. Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic polystyrene beads with multifunctional groups. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 845–849, 2014b.
 299. WANG, T. et al. Immobilization and characterization of γ -Aminobutyric acid on gold surface. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 79, n. 1, p. 201–209, Oct. 2006.
 300. WANG, X.; LAN, P. C.; MA, S. Metal-Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials. **ACS Central Science**, v. 6, n. 9, p. 1497–1506, 23 Sep. 2020.
 301. WANG, X.; UCHIYAMA, S. **Amperometric biosensors equipped with enzyme micelle membrane using polymaleimido-styrene as stabilizer**. Materials Science Forum. **Anais...**2009. Disponível em: <https://www.scientific.net/MSF.614.79>. Acesso em: 20 set. 2025
 302. WEI, S. et al. Functional amyloid-chitin hybrid ink coupled with flexible fabrication approaches for diverse macro and micro-structures. **Materials Today Bio**, v. 13, p. 100179, 2022.
 303. WOLNY, A.; CHROBOK, A. Silica-Based Supported Ionic Liquid-like Phases as Heterogeneous Catalysts. **Molecules**, v. 27, n. 18, p. 5900, 2022.
 304. WU, B. Y. et al. Layer-by-layer assemblies of chitosan/multi-wall carbon nanotubes and

- glucose oxidase for amperometric glucose biosensor applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 1, p. 346–349, 2009.
305. WU, C. L. et al. Characterization of lysine-tagged *Bacillus stearothermophilus* leucine aminopeptidase II immobilized onto carboxylated gold nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 54, n. 3–4, p. 83–89, 2008.
306. WU, H. et al. Enhanced stability of catalase covalently immobilized on functionalized titania submicrospheres. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1438–1445, 2013.
307. WU, J.; YIN, L. Platinum nanoparticle modified polyaniline-functionalized boron nitride nanotubes for amperometric glucose enzyme biosensor. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 11, p. 4354–4362, 23 Nov. 2011.
308. WU, Q. et al. Host molecules inside metal-organic frameworks: host@MOF and guest@host@MOF (Matrjoschka) materials. **Chemical Society Reviews**, v. 54, n. 2, p. 601–622, 2024.
309. WU, S. J. et al. Restriction Enzyme Analysis of Double-Stranded DNA on Pristine Single-Walled Carbon Nanotubes. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 10, n. 43, p. 37386–37395, 31 Oct. 2018.
310. YANG, H. et al. Maleimide-containing polymer inverse opals: A new kind of reactive photonic structure with significant extendibility. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 1, n. 38, p. 6120–6128, 2013.
311. YANG, Q. et al. Biopolymer coating for particle surface engineering and their biomedical applications. **Materials Today Bio**, v. 16, p. 100407, 2022.
312. YANG, Q. Z.; CHANG, Y. Y.; ZHAO, H. Z. Preparation and antibacterial activity of lysozyme and layered double hydroxide nanocomposites. **Water Research**, v. 47, n. 17, p. 6712–6718, 2013.
313. YAREN, O.; BENNER, S. A. Restriction enzymes cleave DNA immobilized on micron-sized diamond crystallites. **Diamond and Related Materials**, v. 52, p. 18–24, 2015.
314. YUCESOI, D. T. et al. Direct bioelectrocatalysis at the interfaces by genetically engineered dehydrogenase. **Bioinspired, Biomimetic and Nanobiomaterials**, v. 4, n. 1, p. 79–89, 1 Mar. 2015.
315. YÜKSEL, E. et al. Preparation of bioactive and antimicrobial PLGA membranes by magainin II/EGF functionalization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 162–168, 2016.
316. ZANONI, M. et al. Antifouling activity of enzyme-functionalized silica nanobeads.

- Biotechnology and Bioengineering**, v. 113, n. 3, p. 501–512, 1 Mar. 2016.
317. ZARGHAMI, V. et al. In vitro bactericidal and drug release properties of vancomycin-amino surface functionalized bioactive glass nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, v. 241, p. 122423, 2020.
 318. ZAYED, M. E. M. et al. Enhancing the sustainable immobilization of laccase by amino-functionalized PMMA-reinforced graphene nanomaterial. **Journal of Environmental Management**, v. 351, 2024.
 319. ZHANG, T. et al. Glucose oxidase and polydopamine functionalized iron oxide nanoparticles: Combination of the photothermal effect and reactive oxygen species generation for dual-modality selective cancer therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 7, n. 13, p. 2190–2200, 2019.
 320. ZHAO, J. et al. Covalent immobilization of penicillin G acylase on aminopropyl-functionalized mesostructured cellular foams. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7211–7217, 2010.
 321. ZHENG, H. et al. Mesoporous support designed for DhaA adsorption with improved stability. **Journal of Porous Materials**, v. 26, n. 3, p. 829–837, 15 Jun. 2019.
 322. ZHOU, L. et al. Magnetic nanoparticles for the affinity adsorption of maltose binding protein (MBP) fusion enzymes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 22, n. 14, p. 6813–6818, 2012.
 323. ZHOU, W. et al. Programmable Protein-DNA Composite Nanostructures: from Nanostructure Construction to Protein-Induced Micro-Scale Material Self-Assembly and Functionalization. **Small**, v. 21, n. 30, 29 Jul. 2025a.
 324. ZHOU, Y. et al. Site-Selective Functionalization of Outer Surface and Different Inner Spaces of Nanoscale Hierarchically Mesoporous MOFs for the Specific Detection of Cancer Cells. **ACS Applied Nano Materials**, v. 7, n. 15, p. 18006–18013, 9 Aug. 2024.
 325. ZHOU, Y. et al. Green surface modification of nylon membrane to site-specifically co-immobilize xylanase and lichenase for clean production of reducing sugar and juice clarification. **Journal of Cleaner Production**, v. 486, p. 144438, 2025b.
 326. ZNISZCZOŁ, A. et al. Covalently immobilized lipase on aminoalkyl-, carboxy- and hydroxy-multi-wall carbon nanotubes in the enantioselective synthesis of Solketal esters. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 87–88, p. 61–69, 2016.
 327. ZUCCA, P. et al. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1577, 2016.
 328. ZUCCA, P.; SANJUST, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme

immobilization: Methods and mechanisms. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14139–14194, 2014.