



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

**KATERINE DA SILVA MOREIRA**

**EXPLORANDO TÉCNICAS E MATERIAIS PARA A PREPARAÇÃO DE  
CATALISADORES ENZIMÁTICOS VIA NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
E COIMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

**FORTALEZA-CE**

**2021**

**KATERINE DA SILVA MOREIRA**

**EXPLORANDO TÉCNICAS E MATERIAIS PARA A PREPARAÇÃO DE  
CATALISADORES ENZIMÁTICOS VIA NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
E COIMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

**FORTALEZA-CE**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- M837e Moreira, Katerine da Silva.  
Explorando técnicas e materiais para a preparação de catalisadores enzimáticos via nanopartículas magnéticas e coimobilização de lipases / Katerine da Silva Moreira. – 2021.  
136 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos.
1. Imobilização. 2. Lipases. 3. Coimobilização. 4. Quitosana. 5. Nanopartículas Magnéticas. I. Título.  
CDD 660
-

**KATERINE DA SILVA MOREIRA**

**EXPLORANDO TÉCNICAS E MATERIAIS PARA A PREPARAÇÃO DE  
CATALISADORES ENZIMÁTICOS VIA NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS  
E COIMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientador: Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos

Aprovada em: 09/09/2021.

**BANCA EXAMINADORA**

---

PROF. DR. JOSÉ CLEITON SOUSA DOS SANTOS (Orientador)  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. ARTEMIS PESSOA GUIMARÃES  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. RITA KAROLINNY CHAVES DE LIMA  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

Aos meus amados pais, Lucineide e Valdir.  
Aos meus irmãos Kennedy e Kérole.  
Com meu carinho e amor.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por seu amor e misericórdia sempre presente em minha vida; por ter me iluminado e guiado o meu caminho para que eu pudesse chegar até aqui; por ter me concedido saúde, motivação e perseverança na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Lucineide e Valdir, pelo amor, por todo o apoio na minha formação pessoal e profissional, pelo sustento, pela atenção, pelo incentivo, pela compreensão e por serem a base necessária para o que me tornei hoje.

Aos meus irmãos, Kennedy e Kérole, pelo companheirismo, carinho e experiência a mim repassados.

Ao Lourembergue, meu namorado por seu amor, por seu suporte emocional, paciência, companheirismo e por sua dedicação e empenho em me ajudar nos trabalhos laboratoriais.

Ao meu orientador professor Dr. José Cleiton Sousa dos Santos, pela oportunidade de ingressar na vida acadêmica desde a graduação; pela confiança depositada em meu trabalho, por toda paciência, ensinamentos e excelente orientação. Meu eterno agradecimento por todas as conquistas que compartilhamos e por sua contribuição no meu crescimento profissional.

A professora Dr<sup>a</sup>. Artemis Pessoa Guimarães, por ter me concedido a primeira oportunidade de ser sua orientanda na graduação. Pela confiança, paciência e dedicação. Pois foram, de extrema importância para a minha iniciação a pesquisa acadêmica.

Aos meus amigos André e Rodolpho, meus companheiros de trabalhos, obrigada pelo o apoio emocional, por toda a dedicação e paciência em ajudar, pelo carinho prestado, pela amizade e companheirismo.

Ao grupo de pesquisa GENEZ, professores e alunos, por todo carinho, amizade e suporte necessário para o desempenho das atividades laboratoriais. Em especial a professora Dr<sup>a</sup>. Maria Cristiane Martins de Sousa, pelo apoio na realização deste trabalho.

Ao GQMat (Grupo de Química de Materiais Avançados) e ao Labs (Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica), pelo excelente trabalho em conjunto realizado através dos seguintes colaboradores: Pierre Fachine e Marcos Mattos.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química – DEQ/UFC, pelos conhecimentos adquiridos no curso de Mestrado.

A agência de fomento CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio à pesquisa.

As Professoras, Artemis Pessoa Guimarães e Rita Karolinny Chaves de Lima participantes da banca examinadora da Qualificação e Defesa, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a minha formação acadêmica.

*O Senhor é o meu Pastor e nada me faltará.  
Salmos 23:1*

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo explorar técnicas e materiais utilizados no processo de imobilização para a preparação de catalisadores enzimáticos. O trabalho experimental foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa, a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) foi imobilizada por adsorção à magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), nanopartículas magnéticas (NPM), funcionalizada com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), denominada  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES-RML ou RML-NPM (rendimento de imobilização:  $94,7 \pm 1,0\%$ ; atividade do biocatalisador:  $341,3 \pm 1,2 U_{p\text{-NPB}}/\text{g}$ ) e por ligação covalente ativada com glutaraldeído (GLU) (rendimento de imobilização:  $91,9 \pm 0,2\%$ ; atividade do biocatalisador:  $199,6 \pm 3,5 U_{p\text{-NPB}}/\text{g}$ ). A RML-NPM foi caracterizada por Difração de Raios-X em Pó (XRPD), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), comprovando a incorporação da magnetita e a imobilização da RML na matriz APTES. O biocatalisador imobilizado RML-NPM apresentou a  $60^\circ\text{C}$  meia-vida 16-19 vezes maior do que a lipase solúvel na faixa de pH 5-10. A RML e RML-NPM mostraram maior atividade em pH 7; a enzima imobilizada foi mais ativa do que a enzima livre na faixa de pH (5-10) analisada. RML-NPM foi aplicado à produção de éster etílico a partir de ácidos graxos livres do óleo de babaçu residual, em condições otimizadas ( $30^\circ\text{C}$ , 4 h, 1: 1 (AGLs /álcool) determinadas pelo método de Taguchi, alcançando uma conversão de  $78,9 \pm 0,3\%$  utilizando 9% de RML-NPM. Na segunda etapa, a coimobilização simultânea por ligação covalente da lipase A de *Candida antarctica* (CALA) e lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em quitosana (QUI) ativada com glutaraldeído (GLU), rotulada de CALA-CALB-QUI, foi otimizada utilizando o método de Taguchi. Em condições otimizadas (pH 9, 5mM, 6: 1 (carga de proteína/ g de suporte) e 1 hora), foi possível chegar a  $80,00 \pm 0,01\%$  para o rendimento de imobilização (RI) e  $46,01 \pm 0,35 U/\text{g}$  para a atividade do derivado ( $\text{At}_D$ ); neste caso, a carga de proteína e a força iônica foram os únicos parâmetros estatisticamente significativos e, portanto, os que mais influenciaram o processo de imobilização. Em pH 7, CALA-CALB-QUI apresentou uma meia-vida 2-6 vezes maior do que a mistura de CALA e CALB para uma faixa de temperatura de  $50\text{-}80^\circ\text{C}$ . Na faixa de pH entre 5 e 9, CALA-CALB apresentou maior atividade em pH 7, enquanto CALA-CALB-QUI, exceto em pH 7, foi mais ativa que a mistura de lipases solúveis, especialmente em pH 9. QUI, QUI-GLU e CALA-CALB-QUI foram caracterizados por XRPD, FTIR, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Termogravimetria (TGA) e Espectroscopia de Energia



Dispersiva (EDS), comprovando a imobilização de CALA e CALB em quitosana. O derivado CALA-CALB-QUI foi avaliado na resolução cinética de halohidrinacetatos rac-2-bromo-1-(2-clorofenil) acetato de etila (**2a**) e rac-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil) etil acetato (**2b**), para produzir as correspondentes halohidrinacetatos 3a-b, que são intermediários na síntese dos fármacos clorprenalina (antiarrítmico) e luliconazol (antifúngico), respectivamente. (S)-bromohidrina (**3a**) foi obtida com 79% de excesso enantiomérico (*ee*), enquanto (S)-clorohidrina (**3b**) foi produzida com 98% *ee*, conversão de 46% e  $E > 200$ . Adicionalmente, o *docking* molecular foi realizado para elucidar a reação de interação de hidrólise entre  $\beta$ -halohidrinacetatos e as lipases CALA e CALB.

**Palavras- Chave:** Imobilização. Lipases. Coimobilização. Quitosana. Nanopartículas magnéticas.

## ABSTRACT

This communication aimed to explore the techniques and materials used in the immobilization process for enzymatic catalysts development. The experiments were conducted in two stages: in the first stage, Lipase from *Rhizomucor miehei* (RML) was immobilized by adsorption on magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), magnetic nanoparticles (MNPs), coated with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), called  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@APTES-RML}$  or RML-NPM (immobilization yield:  $94.7 \pm 1.0\%$ ; biocatalyst activity:  $341.3 \pm 1.2 \text{ Up-NPB/g}$ ), and by covalent bonding activated with glutaraldehyde (GLU) (immobilization yield:  $91.9 \pm 0.2\%$ ; biocatalyst activity:  $199.6 \pm 3.5 \text{ Up-NPB/g}$ ). RML-NPM was characterized by X-ray Powder Diffraction (XRPD), Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), and Transmission Electron Microscopy (TEM), proving the incorporation of magnetite and the immobilization of RML on the APTES matrix. The results demonstrate that the immobilized biocatalyst exhibited at  $60^\circ\text{C}$  a half-life of 16-19 times superior to the soluble lipase in the pH range 5-10. RML and RML-NPM showed greater activity at pH 7; the immobilized enzyme was more active than the free enzyme in the pH range (5-10) analyzed. Moreover, RML-NPM was applied to the production of ethyl ester from free fatty acids from residual babassu oil, under optimized conditions ( $30^\circ\text{C}$ , 4 h, 1:1 (AGLs/alcohol) determined by the Taguchi method, achieving a conversion of  $78.9 \pm 0.3\%$  using 9% RML-NPM. Whereas, in the second step, Lipase A from *Candida antarctica* (CALA) and lipase B from *Candida antarctica* (CALB) were simultaneous co-immobilization onto chitosan (CHI) and activated with glutaraldehyde, labeled CALA-CALB-CHI, by covalent bonding; this process was optimized using the Taguchi method. Under optimized conditions (pH 9, 5mM, 6: 1 (protein load/g of support) and 1 hour), it was possible to reach  $80.00 \pm 0.01\%$  for the immobilization yield (IY) and  $46.01 \pm 0.35 \text{ U/g}$  for derivative activity ( $A_{\text{D}}$ ); in this case, protein charge and ionic strength were the only parameters that have statistical significance and, therefore, those that most influenced the immobilization process. At pH 7, CALA-CALB-CHI showed a half-life of 2-6 times greater than the mixture of CALA and CALB over a temperature range of  $50\text{-}80^\circ\text{C}$ . In the pH range between 5 and 9, CALA-CALB showed greater activity at pH 7, while CALA-CALB-CHI, except at pH 7, was more active than the mixture of soluble lipases, especially at pH 9. CHI, CHI-GLU, and CALA-CALB-CHI were characterized by XRPD, FTIR, Scanning Electron Microscopy (SEM), Thermogravimetry (TGA), and Energy Dispersive X-ray Spectroscopy (EDS), proving the immobilization of CALA and

CALB on chitosan. Besides, the CALA-CALB-CHI derivative was evaluated in the kinetic resolution of halohydrins rac-2-bromo-1-(2-chlorophenyl) ethyl acetate (**2a**) and rac-2-chloro-1-(2,4-dichlorophenyl) acetates ethyl acetate (**2b**), to produce the corresponding halohydrins 3a-b, which are intermediates in the synthesis of the drugs clorprenaline (antiarrhythmic) and luliconazole (antifungal), respectively. (S)-bromohydrin (**3a**) was obtained with 79% enantiomeric excess (*ee*), while (S)-chlorohydrin (**3b**) was produced with 98% *ee*, 46% conversion, and E>200. Additionally, molecular *docking* was performed to elucidate the hydrolysis interaction reaction between  $\beta$ -halohydrin acetates and the lipases CALA and CALB.

**Keywords:** Immobilization. Lipases. Co-immobilization. Chitosan. Magnetic Nanoparticles.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Equilíbrio conformacional e ativação interfacial de lipases..... 30
- Figura 2** – Representação da estrutura 3D da lipase de *Rhizomucor miehei*: Conformação Fechada (código PDB: 3TGL); Conformação Aberta (código PDB: 4TGL) com resíduos da tríade catalítica SER144 (vermelho), ASP203 (verde), HIS257 (azul). Todas as estruturas 3D foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional ..... 31
- Figura 3** – Representação da estrutura 3D da lipase A de *Candida antarctica*: Conformação Fechada (código PDB: 3GUU); Conformação Aberta (código PDB: 3GUU) com resíduos da tríade catalítica SER184 (vermelho), ASP334 (azul), HIS366 (amarelo). Todas as estruturas 3D foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional ..... 32
- Figura 4** – Representação da estrutura 3D da lipase B de *Candida antarctica*: Conformação Aberta (código PDB: 1TCA) com resíduos da tríade catalítica SER105 (verde), ASP187 (azul), HIS224 (amarelo). Todas as estruturas 3D foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional..... 34
- Figura 5** - Estruturas 2D de acetatos de  $\beta$ -halohidrina..... 62
- Figura 6** - Padrões de XRPD de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES antes e depois da imobilização química e física da RML e padrão de referência de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , JCPDS 01-086-1358..... 68
- Figura 7** - Imagens MET das amostras estudadas: (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES, (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES-GLU, (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES-GLU-RML e (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES-RML. A inserção em cada micrografia exibe o gráfico de tamanho de distribuição construído com base na medição de 100 NPsM escolhidos aleatoriamente ..... 68
- Figura 8** - Espectros de FTIR de NPsM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES antes e depois da imobilização química e física de RML..... 70
- Figura 9** - Curvas de magnetização a 300 K de NPsM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES antes e depois da imobilização química e física de RML ..... 71
- Figura 10** - Efeito do valor de pH na atividade de *p*-NPB da RML (triângulos pretos) e RML-MNP (quadrados vermelhos). Mais detalhes são fornecidos na Seção 2. 100% é considerado a atividade da enzima livre em pH 7 (condições ótimas para a enzima) e corresponde a cerca de 450 U/mg..... 71
- Figura 10** - Superfícies de contorno para produção de biodiesel. (A) Razão Molar (AGLs/álcool) versus biocatalisador (%). (B) Razão Molar (AGLs/álcool) versus Tempo (h). (C) Temperatura (°C) versus biocatalisador (%). ..... 78
- Figura 11** - Relação S/R para tempo, força iônica, pH e concentração de proteína para otimização de imobilização CALA e CALB em QUI. .... 80

<b>Figura 12</b> - Superfícies de contorno para a imobilização de CALA-CALB-QUI. (A) Concentração de Proteína (mg /g) versus tempo (h). (B) Concentração de Proteína (mg /g) versus pH.....	84
<b>Figura 13</b> - Capacidade de carga de quitosana para CALA e CALB em pH 9 (5 mM), por 1 hora .....	85
<b>Figura 14</b> - Estabilidade de armazenamento da preparação CALA-CALB-QUI durante 45 dias.....	85
<b>Figura 15</b> - Efeito do pH (4-9, 5mM) nas atividades CALA-CALB e CALA-CALB-QUI. ....	86
<b>Figura 16</b> - Atividade residual de CALA-CALB (A) e CALA-CALB-QUI (B) em diferentes temperaturas (50-80 ° C) após a incubação (5 mM, pH 9) para o tempo específico (0,5-24h). ....	88
<b>Figura 17</b> - (A) Espectros de FTIR de QUI-GLU-CALA-CALB, QUI-GLU e QUITOSANA. (B) padrões de XRD dos QUIs antes e depois da imobilização de CALA e CALB. (C) Perfis de termodegradação (TGA). (D) Curvas DTG de QUI-GLU-CALA-CALB e seus componentes individuais .....	91
<b>Figura 18</b> - Micrografias MEV de amostras /mapas EDS (inserção) de (a) QUITOSANA, (c) QUI-GLU e (e) QUI-GLU-CALA-CALB. Espectros elementares de amostras (b) QUITOSANA, (d) QUI-GLU e (f) QUI-GLU-CALA-CALB. ....	92
<b>Figura 19</b> - Resolução cinética, via reação de hidrólise, de ésteres racêmicos <b>2a</b> e <b>2b</b> usando CALA-CALB-QUI. ....	94
<b>Figura 20</b> - (a) O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp334-His366-Ser184 (azul) e as interações de resíduos do acetato de $\beta$ -bromoidrina. (b) O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp334-His366-Ser184 (azul) e as interações de resíduos do acetato de $\beta$ -cloroidrina .....	96
<b>Figura 21</b> - (a) O sítio ativo da lipase CALB com a tríade catalítica Asp187-His224-Ser105 (azul) e as interações de resíduos de acetato de $\beta$ -bromoidrina. (b) O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp187-His224-Ser105 (azul) e as interações de resíduos o acetato de $\beta$ -clorohidrina .....	97

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Enzimas imobilizadas em quitosana .....	39
<b>Tabela 2</b> – Lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas .....	41
<b>Tabela 3</b> - Fatores independentes e seus respectivos níveis do projeto experimental para a produção dos ésteres etílicos de ácidos graxos .....	54
<b>Table 4</b> - Fatores independentes e seus respectivos níveis de imobilização para CALA-CALB-QUI.....	57
<b>Tabela 5</b> - Parâmetros de imobilização da RML: (10 mg de proteína por 0,1 g de suporte foi o carregamento dos suportes, e os experimentos foram realizados em fosfato de sódio 25 mM, pH 7 na temperatura de 25 °C).....	65
<b>Tabela 6</b> - Meia-vida para RML e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @APTES a 60 °C e pHs 5, 7 e 10. ....	73
<b>Tabela 7</b> - Método de Taguchi para a reação de esterificação dos ácidos graxos do óleo de babaçu. ....	75
<b>Tabela 8</b> - Resposta das relações S/R.....	76
<b>Tabela 9</b> - ANOVA para parâmetros que afetam a esterificação do óleo de babaçu.....	79
<b>Tabela 10</b> - Matriz do projeto de matriz ortogonal L9 juntamente com os valores de atividade CALA-CALB-QUI e as razões S/R. ....	79
<b>Tabela 11</b> – Tabela de resposta de relações S/R. ....	82
<b>Tabela 12</b> – Resultados da ANOVA para os parâmetros que afetam a imobilização ....	83
<b>Tabela 13</b> - Tempo de meia-vida de diferentes temperaturas CALA-CALB e CALA-CALB-QUI incubadas em tampão de fosfato de sódio (5mM, pH 7). ....	89
<b>Tabela 14</b> – Resultados da resolução cinética de rac-2a e rac-2b usando CALA-CALB-QUI .....	94
<b>Tabela 15</b> – Resultado das pontuações com o docking molecular. ....	95

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ANP</b>	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
<b>AGLs</b>	Ácidos graxos livres
<b>APTES</b>	3-aminopropiltriétoxissilano
<b>At<sub>T</sub></b>	Atividade teórica (U/g)
<b>At<sub>D</sub></b>	Atividade do biocatalisador (U/g)
<b>At<sub>R</sub></b>	Atividade de recuperação (%)
<b>CALA</b>	Lipase A de <i>Candida antarctica</i>
<b>CALA-CALB-QUI</b>	Biocatalisador (quitosana, ativada com glutaraldeído e coimobilizada com CALA e CALB)
<b>CALB</b>	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
<b>FAEE</b>	Fatty acid ethyl ester
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	Magnetita
<b>FTIR</b>	Infravermelho com Transformada de Fourier
<b>GLU</b>	Glutaraldeído
<b>MET</b>	Microscopia Eletrônica de Transmissão
<b>MNPs</b>	Magnetic nanoparticles
<b>NPsM</b>	Nanopartículas Magnéticas
<b><i>p</i>-NPB</b>	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
<b>RI</b>	Rendimento de Imobilização (%)
<b>RML</b>	Lipase de <i>Rhimucor miehei</i>
<b>RML-NPM</b>	Biocatalisador (nanopartícula magnética, revestida com 3-aminopropiltriétoxissilano, ativada com glutaraldeído e imobilizada com RML)
<b>S/R</b>	Sinal/ Ruído
<b>XRPD</b>	Difração de Raios-X em Pó
<b>@</b>	recobrimento (exemplo: Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @APTES)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Objetivos específicos .....</b>	<b>27</b>
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1 Enzimas .....</b>	<b>28</b>
<b>3.2 Lipases.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 <i>Lipase de Rhizomucor miehei (RML)</i> .....	30
3.2.2 <i>Lipase A de Candida antarctica (CALA)</i> .....	32
3.2.3 <i>Lipase B de Candida antarctica (CALB)</i> .....	33
<b>3.3 Imobilização de Enzimas .....</b>	<b>35</b>
3.3.1 <i>Imobilização em Quitosana (QUI)</i> .....	38
3.3.2 <i>Imobilização em Nanopartículas Magnéticas (NPsM)</i> .....	40
3.3.3 <i>Recobrimento com 3-aminopropiltriétoxisilano</i> .....	43
3.3.4 <i>Ativação com Glutaraldeído</i> .....	43
<b>3.4 Aplicações.....</b>	<b>44</b>
3.4.1 <i>Biodiesel (Ésteres etílicos de ácidos graxos)</i> .....	44
3.4.2 <i>Haloidrinas</i> .....	45
<b>3.5 Planejamento Experimental .....</b>	<b>46</b>
3.5.1 <i>Método Taguchi</i> .....	47
<b>3.6 Docking Molecular .....</b>	<b>47</b>
<b>4 MATERIAIS e MÉTODOS .....</b>	<b>49</b>
<b>Etapa 1 - Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas: desempenho em produção otimizada de éster etílico de ácido graxo pelo método de Taguchi .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Materiais .....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Métodos .....</b>	<b>49</b>
4.2.1 <i>Síntese de nanopartículas magnéticas de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES)</i> .....	49
4.2.2 <i>Ativação de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES com glutaraldeído (GLU)</i> .....	50
4.2.3 <i>Imobilização covalente de RML em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU</i> .....	50
4.2.4 <i>Imobilização por adsorção de RML em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES</i> .....	50
4.2.5 <i>Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína</i> .....	51
4.2.6 <i>Parâmetros de imobilização</i> .....	51
4.2.7 <i>Caracterização dos materiais obtidos</i> .....	51
4.2.8 <i>Efeito do pH na atividade do biocatalisador</i> .....	52



4.2.9 Estabilidade térmica.....	52
4.2.10 Produção de ácidos graxos livres (AGLs) a partir do óleo de babaçu.....	53
4.2.11 Otimização da produção de éster etílico de ácido graxo.....	53
4.2.12 Planejamento experimental e análise estatística (Método Taguchi).....	54
4.2.13 Análise de cromatografia gasosa (CG).....	55
<b>Etapa 2 – Coimobilização das Lipases A e B de <i>Candida antarctica</i> em quitosana otimizado pelo método de Taguchi: Caracterização, aplicação de resolução cinética e estudos de docking molecular.....</b>	<b>55</b>
<b>4.3 Materiais .....</b>	<b>55</b>
<b>4.4 Métodos .....</b>	<b>56</b>
4.4.1 Preparação da Quitosana (QUI).....	56
4.4.2 Ativação da quitosana com glutaraldeído (GLU) .....	56
4.4.3 Otimização da imobilização da lipase A de <i>Candida antarctica</i> (CALA) e da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) em Quitosana (QUI) .....	56
4.4.4 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína .....	57
4.4.5 Parâmetros de Imobilização.....	58
4.4.6 Capacidade de carga de QUI para CALA:CALB .....	58
4.4.7 Efeito do pH na imobilização .....	58
4.4.8 Desativação Térmica.....	59
4.4.9 Caracterização dos materiais obtidos.....	59
4.4.10 Análise de halodrinhas acetatos 2a-b e halodrinhas 3a-b.....	60
4.4.11 Caracterização completa dos compostos 2a-b e 3a-b.....	61
4.4.12 Docking Molecular - Preparação de ligantes e proteínas .....	62
4.4.13 Docking molecular .....	62
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>64</b>
<b>Etapa 1 - Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em nanopartículas magnéticas: desempenho em produção otimizada de éster etílico de ácido graxo pelo método de Taguchi .....</b>	<b>64</b>
<b>5.1 Parâmetros de imobilização .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2 Caracterização dos biocatalisadores.....</b>	<b>67</b>
<b>5.3 Efeito do pH.....</b>	<b>71</b>
<b>5.4 Estabilidade térmica .....</b>	<b>73</b>
<b>5.5 Otimização da produção de éster etílico de ácido graxo.....</b>	<b>74</b>
<b>Etapa 2 – Coimobilização das Lipases A e B de <i>Candida antarctica</i> em quitosana otimizado pelo método de Taguchi: Caracterização, aplicação de resolução cinética e estudos de docking molecular.....</b>	<b>79</b>
<b>5.6 Otimização da imobilização de CALA e CALB em QUI.....</b>	<b>79</b>

<b>5.7 Perfil de pH.....</b>	<b>86</b>
<b>5.8 Desativação térmica .....</b>	<b>87</b>
<b>5.9 Caracterização dos materiais .....</b>	<b>89</b>
<b>5.10 Análise de halodrinas acetatos 2a-b e halodrinas 3a-b.....</b>	<b>93</b>
<b>5.11 Análise do docking molecular .....</b>	<b>95</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>98</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de biocatalisadores nas reações de catálise é uma alternativa promissora em relação a catálise química convencional (HAUER, 2020; SANTI et al., 2021; SILVA; CAVACO-PAULO; FU, 2015). As enzimas podem ser definidas como macromoléculas complexas produzidas a partir de organismos vivos, que reduzem a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis nas reações e podem atuar em condições amenas de pressão, temperatura e pH, o que implica em uma redução da demanda energética e o desgaste térmico do produto (FILHO; SILVA; GUIDINI, 2019; MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; NAWAL et al., 2019; PATEL et al., 2019). Essas macromoléculas são biocatalisadores biodegradáveis, biocompatíveis e evitam a produção de elementos tóxicos, pois conduzem a reação para a formação de um produto específico (DE REGIL; SANDOVAL, 2013; SHELDON; BASSO; BRADY, 2021; SHELDON; PEREIRA, 2017). Entre as enzimas, as lipases (E.C. 3.1.3 triaglicerol acil hidrolases) são as mais utilizadas em catálise (ARANA-PEÑA et al., 2020b, 2021; BRAHAM et al., 2021; LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020; MORELLON-STERLING et al., 2021).

A função natural das lipases é catalisar a reação de hidrólise de triglicerídeos para produzir ácidos graxos livres e glicerol glycerol (CHANDRA et al., 2020; LI et al., 2021b; ZECHNER et al., 2012). Contudo, devido a sua ampla especificidade e seletividade de substrato, elas são utilizadas na catálise de diversas reações, como esterificação, hidrólise, interesterificação, acidólise, aminólise e resolução de misturas racêmicas, atuando com alta estabilidade e diversidade (AGUIEIRAS et al., 2019; CAVALCANTE et al., 2021; CHOI et al., 2018; CHOJNACKA; GŁADKOWSKI, 2018; DOS SANTOS et al., 2015a; DWIVEDEE et al., 2018; MONTEIRO et al., 2021a; XIE; ZANG, 2017; ZENG et al., 2018).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) é uma proteína extracelular de origem fúngica, composta por uma cadeia proteica única polipeptídica constituída por 269 aminoácidos (BRADY et al., 1990). A enzima possui uma massa molecular de 31.600 Dalton e um ponto isoelétrico (pI) de 3,8 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b; WU; JÄÄSKELÄINEN; LINKO, 1996). Esta lipase foi inicialmente projetada e produzida principalmente para ser utilizada em modificações de óleos e gorduras, devido a isso, encontrou diversas aplicações na indústria alimentícia (BOEL et al., 1988; NAGAOKA; YAMADA, 1973; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b).

---

Além do setor alimentício, esta enzima pode ser utilizada na química orgânica, da química fina à produção de biodiesel, principalmente em processos regio ou enantiosseletivo ou específicos (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

A lipase A de *Candida antarctica* (CALA) e a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), são produzidas a partir da levedura basidiomiceto *Candida antarctica* (HØEGH et al., 1995; KIRK; CHRISTENSEN, 2002; MONTEIRO et al., 2021b; NIELSEN; ISHII; KIRK, 1999). Contudo, como a produção de lipases oriundas das cepas originais da levedura basidiomiceto *Candida antarctica* eram bem limitadas, as duas isoenzimas foram superexpressas e clonadas em *Aspergillus oryzae* (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005; HØEGH et al., 1995). CALB é uma proteína largamente utilizada, devido a sua alta estabilidade e capacidade de performance em diversos substratos, sendo aplicada nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e de bebidas (DE SOUZA et al., 2020; KAPOOR; GUPTA, 2012; MONTEIRO et al., 2019a, 2019b; RABBANI et al., 2015; RODRIGUES et al., 2008; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001; VERDASCO-MARTÍN et al., 2016). No caso da CALA, apesar de possuir características interessantes, ainda não foi tão explorada (KIRK; CHRISTENSEN, 2002).

CALA é uma lipase extremamente termoestável, que apresenta uma temperatura ótima de 70 °C em pH 6,5. Possui um peso molecular de 45 kDa, ponto isoelétrico de 7,5, pH ótimo em torno de 7,0, exibindo maior estabilidade em pH ácido (HARI KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002; KIRK; CHRISTENSEN, 2002; MONTEIRO et al., 2019a, 2019b; VERDASCO-MARTÍN et al., 2016; ZAMOST; NIELSEN; STARNES, 1991). A CALA demonstra atividade utilizando grandes substratos, como por exemplo, álcoois volumosos e ésteres terciários, e permite acomodar substratos que são estericamente impedidos (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005; SANDSTROM et al., 2012). CALB apresenta menor estabilidade, a sua temperatura ótima é de aproximadamente 40 °C, possui peso molecular de 33 kDa, ponto isoelétrico 6,0 e pH ótimo operacional 7,0, além de dispor de uma tampa pequena que não isola completamente o sítio ativo da reação (GOTOR-FERNÁNDEZ; BUSTO; GOTOR, 2006; KUMAR et al., 2019a; LIMA et al., 2019). O sítio ativo de ambas as lipases são formadas por uma tríade catalítica de serina hidrolases (ERICSSON et al., 2008; KUMAR et al., 2019a).

No entanto, a utilização de enzimas solúveis na indústria é limitada devido a problemas relacionados a sua estabilidade moderada quando submetidas a condições

---

severas de temperatura e pH, podendo ser inibidas pelo o substrato e até mesmo pelo produto, e também por conta da sua difícil recuperação e posterior reutilização do biocatalisador (BETIGERI; NEAU, 2002; LERESCHE; MEYER, 2006; NUNES et al., 2021; SHELDON; VAN PELT, 2013; SIVA DEEPTHI et al., 2014). Contudo, essas desvantagens podem ser mitigadas quando protocolos de imobilização enzimática adequadas em suportes sólidos insolúveis são empregadas (REIS et al., 2019; RODRIGUES et al., 2019). Por meio dos avanços na engenharia enzimática, é possível melhorar as propriedades catalíticas das enzimas, como a estabilidade, seletividade e especificidade (ALI; ISHQI; HUSAIN, 2020; BEAUFILS et al., 2021; BELL et al., 2021; MAZURENKO; PROKOP; DAMBORSKY, 2020).

Neste contexto, diversas técnicas de imobilização enzimática podem ser utilizadas, como adsorção e ligação covalente (ARANA-PEÑA et al., 2020b; BILAL et al., 2021; YU et al., 2021). A coimobilização de diferentes enzimas simultaneamente no mesmo suporte, por meio da ligação covalente multipontual vem ganhando cada vez mais espaço para o desenvolvimento de biocatalisadores multifuncionais (HWANG; LEE, 2019; XU et al., 2020). A coimobilização aleatória é a estratégia mais simples para criar um sistema multienzimático; neste, várias enzimas são anexadas aleatoriamente à superfície ou embutidas no suporte por quaisquer técnicas de imobilização (ARANA-PEÑA et al., 2020a; BETANCOR; LUCKARIFT, 2010).

Além disso, a coimobilização de diferentes enzimas no mesmo suporte pode ser realizada por meio de ligação covalente multiponto (ARANA-PEÑA et al., 2020b; LIU; DONG, 2020). A ligação covalente é um método conveniente para imobilização enzimática, pois fornece rigidez enzimática e é considerada um dos mecanismos mais eficazes para melhorar a estabilidade da enzima (BEZERRA et al., 2017; GARCÍA-GARCÍA et al., 2020; REIS et al., 2019; SINGH et al., 2013; XU et al., 2020). O biocatalisador coimobilizado atua de diferentes maneiras: eliminando etapas de reação que ocorrem em vários processos, melhorando a estabilidade da enzima por meio da geração in-situ do substrato e ajudando a eliminar subprodutos indesejados (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010; RUEDA et al., 2015; SHAHEDI et al., 2019). Além disso, o desenvolvimento de um sistema multienzimático coimobilizado leva a uma redução da produção de intermediários e subprodutos indesejáveis por meio de reações em uma única etapa em vez de várias etapas isoladas, o que torna o processo menos caro

---

e mais ecológico (JIA; NARASIMHAN; MALLAPRAGADA, 2014; KANG et al., 2014; ZHANG, 2011).

As características mecânicas, químicas, cinéticas e bioquímicas da proteína imobilizada são determinadas pelas propriedades das proteínas e pelo suporte (CAO; LANGEN; SHELDON, 2003; ZDARTA et al., 2018). O material usado como suporte pode ter consequências significativas nas propriedades do sistema biocatalítico (ZDARTA et al., 2018). Assim, o suporte deve apresentar uma superfície adequada para que ocorra a interação com as enzimas, além de possuir múltiplos grupos reativos que reagem com a enzima para realizar inúmeras ligações covalentes multiponto (SANTOS et al., 2015). Neste estudo dois materiais foram utilizados para realizar as metodologias de imobilização, a quitosana, uma forma desacetilada de quitina (KACZMAREK et al., 2019; RAKSHIT; HALDER; MONDAL, 2020), foi explorada como um suporte para coimobilização de CALA e CALB, e as nanopartículas magnéticas revestidas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) foram exploradas na imobilização da RML.

Suportes empregando materiais em nanoescala estão sendo largamente utilizados para a imobilização enzimática, pois possuem uma grande área de superfície, possibilitando o aumento da carga enzimática (SUO et al., 2019) (XIE; MA, 2009a). Nos últimos anos, nanopartículas magnéticas (NPsM) fabricadas em magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), estão sendo utilizadas para a imobilização de enzimas por conta das suas diversas vantagens, como separação fácil e rápida da reação pela simples aplicação de um campo magnético, baixa resistência à transferência de massa, alta estabilidade e baixa toxicidade (LYU et al., 2019; ROSSI et al., 2014) (JAVANBAKHT et al., 2016; WAHAJUDDIN; ARORA, 2012; XIE; MA, 2009a).

Para que ocorra a imobilização as nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  precisam ser revestidas com substâncias quimicamente ativas na busca de reduzir a formação de agregação das partículas, reduzir as interações inespecíficas, preservar quanto ao processo de oxidação, e conceder a formação de grupos funcionais (CHEN et al., 2014) (WAHAJUDDIN; ARORA, 2012). O 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) pode ser utilizado para revestir as NPsM, é um reagente organossilano que dispõe de hidroxilas funcionalizantes. Ele é amplamente empregado em protocolos de imobilização enzimática (BEZERRA et al., 2017; RIOS et al., 2016).

A quitina é o segundo polímero mais abundante na natureza, estando presente principalmente em exoesqueletos de crustáceos (ROUHANI SHIRVAN; SHAKERI;

BASHARI, 2019; ZAINOL ABIDIN et al., 2020; ZHANG et al., 2021). A quitosana é um biomaterial atraente para ser utilizado como suporte devido às suas características únicas, como baixo custo, bioatividade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, atóxico, e insolúvel em água (PINHEIRO et al., 2019). Várias configurações geométricas de quitosana, como flocos, pó, membranas e hidrogéis (AHMAD; MANZOOR; IKRAM, 2019; GZYRA-JAGIEŁA et al., 2019; JIMÉNEZ-GÓMEZ; CECILIA, 2020; KHADEMIAN et al., 2020; KRAJEWSKA, 2004), podem ser obtidas no processo de desacetilação da quitina e essas configurações podem ser utilizadas no processo de imobilização da enzima (RAFIEE; REZAEI, 2021; RIBEIRO et al., 2021; TAPDIGOV, 2021). As formas de hidrogéis e membranas são as mais utilizadas devido às alterações físicas obtidas, como o aumento do diâmetro dos poros do suporte, ideal para o processo de imobilização da enzima. Este biopolímero possui uma estrutura linear muito semelhante à celulose, diferindo apenas nos grupos funcionais. Grupos hidroxila (OH) estão presentes na estrutura geral desses biopolímeros (BERGER et al., 2004), porém, a principal diferença entre eles é a presença de grupos amino ( $\text{NH}_2$ ) na estrutura da quitosana. A alta porcentagem de grupos amino reativos distribuídos na matriz polimérica da quitosana permite inúmeras modificações químicas, produzindo um material mais resistente quimicamente e capaz de reduzir a retenção de água (KUMAR et al., 2019b; LOGANATHAN et al., 2020). As reações entre os grupos hidroxila e amino da quitosana no processo de reticulação são realizadas por agentes bifuncionais (ADRIANO et al., 2008). Essa alteração pode ser afetada por vários agentes químicos, como o glutaraldeído (ASLAM et al., 2021; BILGIN SIMSEK; SALOGLU, 2021; NWAGU; OKOLO; AOYAGI, 2021).

O glutaraldeído é um agente bifuncional amplamente utilizado para o processo de imobilização enzimática em suportes que possuem grupos amino (BARBOSA et al., 2013; MOHAMAD et al., 2015; SANTOS et al., 2015). Em suportes pré-ativados com glutaraldeído, a interação que ocorre entre a enzima e o suporte é robusta e a lixiviação de proteínas é reduzida, o que produz um biocatalisador muito versátil devido à presença de frações iônicas, hidrofóbicas e químicas reativas, o que permite a obtenção de um biocatalisador mais estável (BARBOSA et al., 2013, 2014; RIOS et al., 2016; SANTOS et al., 2015).

Dentre as várias possibilidades de aplicação das lipases como biocatalisadores, a síntese de fármacos e insumos farmacêuticos ativos

enantiomericamente puros (APIs), e seus intermediários, tem se destacado como de grande interesse industrial. Nesse sentido, a biocatálise oferece uma alternativa “verde” e atrativa aos processos químicos convencionais, mostrando-se versátil em síntese orgânica, reações com alta seletividade, eficiência e especificidade, e em condições amenas. Esta alternativa verde tem sido usada para obter halohidrinas quirais (FONSECA et al., 2020b). Haloidrinas e seus ésteres correspondentes são uma classe importante de compostos orgânicos usados como intermediários na síntese de várias substâncias bioativas com alto valor agregado (PINTO; SALVADOR; LE ROUX, 2007; SURENDRA et al., 2005; YADAV et al., 2004; ZHANG et al., 2011). Metodologias para a preparação desses intermediários quirais usando lipases são promissoras, pois fornecem uma alternativa sustentável/verde para processos químicos convencionais (ADAM; BLANCAFORT; SAHA-MÖLLER, 1997; FERREIRA et al., 2017; FONSECA et al., 2018; LIMA et al., 2017; LIU; HOFF; ANTHONSEN, 2000). Esta abordagem foi usada para obter a bromoidrina quiral intermediária (**3a**) na síntese de (*R*)-clorprenalina, um antiarrítmico  $\beta$ -bloqueador (LU et al., 2011) e a cloroidrina quiral (**3b**) para obter (*R*)-luliconazol, um antifúngico potente (FONSECA et al., 2018), por meio de resolução enzimática cinética de *rac*-2-bromo-1-(2-clorofenil) acetato de etila (**2a**) e *rac*-2-cloro-1-(2,4-diclorofenil) acetato de etila (**2b**), respectivamente. Aqui, foi proposto avaliar a eficiência do derivado CALA-CALB-QUI na resolução cinética dos acetatos **2a** e **2b**, via reação de hidrólise, para produzir haloidrinas **3a** e **3b**.

Os bioprocessos envolvem a redução das  $\alpha$ -halocetonas correspondentes na presença de células microbianas ou enzimas isoladas (KREDs) (FONSECA et al., 2020b; LIN; TAO, 2017; MARTÍNEZ-LAGOS; SINISTERRA, 2005), além da resolução cinética catalisada por lipase de haloidrinas racêmicas ou seus correspondentes ésteres, sendo este último o mais utilizado (CARVALHO et al., 2015; FONSECA et al., 2020b). Essa classe de enzimas tem uma grande vantagem, que é a de se manter estável em solventes orgânicos, permitindo a solubilização de substratos orgânicos. Além disso, as lipases atuam na ausência de cofatores e são altamente regio-, quimio- e enantiosseletivas. Deve-se notar que as lipases têm sido usadas para catalisar ambos os processos de resolução cinética, acetilação de haloidrinas e a hidrólise dos ésteres correspondentes (MUSA; HOLLMANN; MUTTI, 2019).

Outra aplicação dos biocatalisadores é na produção de biocombustíveis (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; PRAKASH et al., 2013). O uso de catalisadores



---

enzimáticos na produção de biodiesel evita problemas relacionados com a síntese química, em que são gerados coprodutos indesejáveis que contaminam o produto de interesse e produzem águas residuais (ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2017). O biodiesel é uma fonte de energia biodegradável, limpa e renovável (ACHARYA et al., 2019). Ele pode ser obtido por meio de triglicerídeos através da reação de transesterificação ou pode ser produzido a partir de ácidos graxos livres (AGLs) na reação de esterificação, utilizando matérias-primas, como óleos e gorduras animais (NISAR et al., 2017; TIAN et al., 2017). O uso de biocatalisadores enzimáticos imobilizados possibilitam a reutilização do biocatalisador em reações consecutivas, em condições mais leves de reação e a não produção de resíduos químicos ou sabões (ARUMUGAM; PONNUSAMI, 2017; ILMI et al., 2017).

A aplicação de conhecimentos relacionados à estrutura química e ao esclarecimento de alguns detalhes das diferentes taxas de reação e interações enzima-suporte é um dos desafios para encontrar o melhor método para o desenvolvimento de biocatalisadores mais resistentes e estáveis (ZDARTA et al., 2018). O *docking* molecular é uma técnica computacional que permite investigar as estruturas químicas e as possíveis orientações que uma determinada molécula pode assumir dentro do sítio de ligação de um bioreceptor ou entre duas macromoléculas (proteína-proteína ou proteína-DNA) (FONSECA et al., 2020b; LI et al., 2021a). Assim, para avaliar a interação entre o ligante e o sítio ativo da enzima, considerando a interação de menor energia e maior complementaridade química (RIMAC; GRISHINA; POTEKIN, 2021), foram realizados estudos de *docking* de todos os substratos obtidos na catálise dos processos de resolução cinética da acetilação de haloidrinas e a hidrólise dos ésteres correspondentes, utilizando o CALA-CALB-QUI como catalisador.

Nos processos de biocatálise, o desenho experimental utilizando o método de Taguchi (também conhecido como desenho de matriz ortogonal) é uma importante ferramenta a ser utilizada para investigar as variáveis (fatores) que afetam a qualidade do processo de imobilização com um número reduzido de corridas, economizando tempo e recursos (CHAVAN; GAIKWAD, 2021; MOREIRA et al., 2020a; MURALI; FEDIUK, 2020). Nesse sentido, o método de Taguchi foi utilizado para estudar a covariância de variáveis (fatores independentes) para obter a resposta efetiva (fator dependente) na preparação para a co-imobilização ótima das lipases A e B de *Candida antarctica* em

---

Quitosana e na produção de ésteres etílicos obtidos a partir dos ácidos graxos do óleo de babaçu residual.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo principal desse estudo foi coimobilizar as lipases A e B de *Candida antarctica* em Quitosana e imobilizar a lipase de *Rhizomucor miehei* em Nanopartícula Magnética, buscando definir as características e as condições de aplicação dos biocatalisadores.

### 2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar NPM funcionalizadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) e ativado com glutaraldeído (GLU);
- Imobilização da RML em nanopartículas magnéticas funcionalizada e ativada por diferentes estratégias;
- Otimizar a coimobilização de CALA e CALB em quitosana;
- Caracterização dos biocatalisadores imobilizados;
- Aplicar os biocatalisadores em diferentes aplicações.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Enzimas**

As enzimas são macromoléculas complexas produzidas a partir de organismos vivos, elas atuam como catalisadores biológicos em reações metabólicas e bioquímicas específicas, que são necessárias para o desenvolvimento e manutenção da vida (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017; GURUNG et al., 2013). A utilização de enzimas como catalisadores em reações bioquímicas pode ser definida como biocatálise (GURUNG et al., 2013; JEMLI et al., 2016). Elas alteram a velocidade da reação através da redução da energia de ativação, sem modificar o equilíbrio da reação e sem serem consumidas durante o processo. Esses biocatalisadores são eficientes, pois oferecem processos mais competitivos em relação aos catalisadores químicos devido as suas excelentes propriedades (CHOI; HAN; KIM, 2015; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009).

A utilização de enzimas como catalisadores oferece uma série de vantagens, elas trabalham em condições suaves de temperatura, pressão e pH, preferencialmente em soluções aquosas, possuem um elevado grau de especificidade e nível de eficiência catalítica, são biocompatíveis, biodegradáveis e evitam a formação de produtos tóxicos, pois conduzem a reação para a produção de um produto específico (BILAL et al., 2019; BORRELLI; TRONO, 2015; KRAJEWSKA, 2004; SHELDON; VAN PELT, 2013). Por conta dessas características os biocatalisadores exercem um papel positivo em relação aos catalisadores químicos, pois agregam diminuição no custo final do processo, devido a redução do consumo de energia envolvido na reação e da formação de coprodutos e resíduos indesejáveis (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; MENDES, 2009).

Devido a necessidade de encontrar soluções sustentáveis para a indústria, as enzimas estão sendo cada vez mais requeridas (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018). De modo geral, a utilização de enzimas como catalisadores industriais assegura a economia de energia e evita a poluição, o que garante o comprometimento da implementação de estratégias economicamente sustentáveis nos sistemas industriais (BORRELLI; TRONO, 2015; DEMAÏN; ADRIANO, 2008). Contudo, embora o uso dos biocatalisadores como substituintes dos catalisadores químicos apresente vantagem numa perspectiva ambiental, é necessário que suas aplicações forneçam um certo grau de rentabilidade que justifique a sua competitividade com os catalisadores químicos convencionais, do ponto de vista econômico (JEMLI et al., 2016; LISZKA et al., 2012).

A maioria das enzimas empregadas em processos industriais pertencem a classe das hidrolases, dentre estas, as lipases são as enzimas que mais se destacam devido à gama de reações que elas são capazes de catalisar, e podem ser aplicadas desde a área da modificação de alimentos, farmacêutica, química fina até a produção de biocombustíveis (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; PRAKASH et al., 2013). Esses biocatalisadores apresentam uma elevada enantiosseletividade e estabilidade em solventes orgânicos, bem como uma ampla especificidade ao substrato (BORRELLI; TRONO, 2015; PRAKASH et al., 2013).

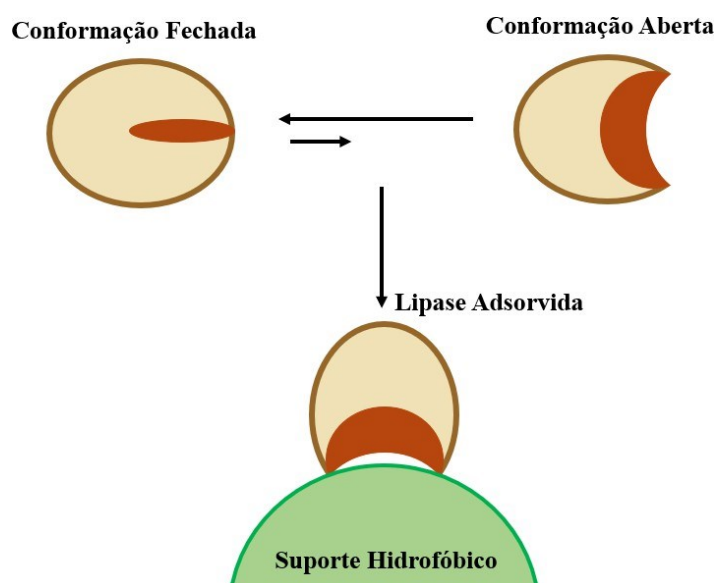
### 3.2 Lipases

As lipases são enzimas que pertencem à classe das hidrolases (EC.3.1.1.3 triacilglicerol hidrolases) (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999). A função natural das lipases é catalisar a reação de hidrólise de triglicérides em glicérides e ácidos graxos na interface óleo-água (BONAZZA et al., 2018; DUARTE et al., 2016; RODRIGUES et al., 2019; ZECHNER et al., 2012). Quando as lipases estão presentes em excesso de água, elas atuam na interface orgânico-aquosa catalisando a hidrólise de ligações éster carboxilato, liberando ácidos graxos e glicerol. Porém, em meios orgânicos reações reversas podem acontecer, devido as alterações no comportamento enzimático as lipases são capazes de catalisar as reações de acidólise, alcóolise, interesterificação, estefiricação, aminólise entre outras reações para produzir novos tipos de lipídios (LIMA et al., 2015; OKORO; SUN; BIRCH, 2019; RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009).

Além das características apresentadas anteriormente, as lipases são enzimas interfaciais que possuem a capacidade de hidrolisar substratos insolúveis. Isso acontece porque a lipase é capaz de se adsorver na superfície desse substrato por meio do mecanismo de ativação interfacial (Figura 1) (DE ABREU et al., 2014; SCHMID; VERGER, 1998). Quando mantidas em meio aquoso, o centro ativo das lipases é isolado do meio reacional por uma cadeia polipeptídica denominada tampa. Elas podem assumir duas formas estruturais: a forma fechada, quando a tampa isola o centro ativo, tornando o mesmo inacessível aos solventes e substratos, pois a face interna da tampa é hidrofóbica e interage com área hidrofóbica do centro ativo, e a forma aberta, quando ocorre a interação com uma área de interação hidrofóbica, ocasionando a abertura da tampa, possibilitando o acesso ao sítio catalítico (BRZOZOWSKI et al., 1991; FERNANDEZ-

LORENTE et al., 2008; MANOEL et al., 2015; RUEDA et al., 2016; VAN TILBEURGH et al., 1993). O sítio catalítico das lipases é formado por três resíduos de aminoácidos, um resíduo ácido catalítico (aspartato ou glutamato), um resíduo nucleofílico (cisteína, serina, ou aspartato) e um resíduo de histidina, a tampa pode ser constituída por uma única hélice, duas hélices ou uma região em loop (DIJKSTRA; REETZ, 1999; DOS SANTOS et al., 2015a)

**Figura 1** - Equilíbrio conformacional e ativação interfacial de lipases.



Fonte: Elaborado pela autora.

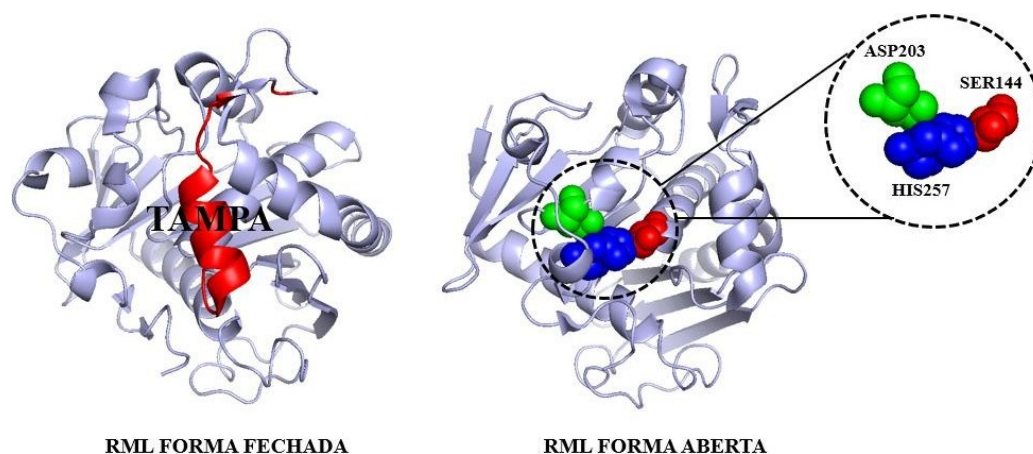
### 3.2.1 Lipase de *Rhizomucor miehei* (RML)

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) foi relatada na literatura pela primeira vez em 1973 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a). É uma proteína extracelular de origem fúngica, composta por uma cadeia proteica única polipeptídica constituída por 269 aminoácidos (BRADY et al., 1990). A RML possui uma massa molecular de 31.600 Dalton e um ponto isoelétrico (pI) de 3,8 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b; WU; JÄÄSKELÄINEN; LINKO, 1996).

A *Rhizomucor miehei* apresenta uma estrutura com conformação em  $\alpha/\beta$  hidrolase formada por uma sequência específica de  $\alpha$  hélices e folhas  $\beta$  pregueadas (BRADY et al., 1990). O seu sítio ativo é composto por uma tríade catalítica formados pelos resíduos dos aminoácidos serina 144, aspartato 203 e histidina 257 (Figura 2). A tampa hidrofóbica da RML é constituída de resíduos de aminoácidos que vão desde a

posição 82 até a 96 (Figura 2) (BRADY et al., 1990; BRZOZOWSKI et al., 1991; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). A “cavidade do oxiânion” é composta pelo esqueleto dos resíduos de serina 82 e leucina 145 (NORIN et al., 1994).

**Figura 2** – Representação da estrutura 3D da lipase de *Rhizomucor miehei*: Conformação Fechada (código PDB: 3TGL); Conformação Aberta (código PDB: 4TGL) com resíduos da tríade catalítica SER144 (vermelho), ASP203 (verde), HIS257 (azul). Todas as estruturas 3D foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

A RML é comercializada em sua forma solúvel (Palatase 200L) e na sua forma imobilizada (Lipozyme RM IM), apresenta alta atividade e estabilidade quando submetida a diversas condições (fluidos supercríticos, solventes orgânicos anidros, etc) (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). O Duolite ES562 é o suporte utilizado na imobilização desta lipase, trata-se de uma resina de troca iônica fraca composta pelo copolímero fenol-formaldeído (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b).

Esta lipase foi inicialmente projetada e produzida principalmente para ser utilizada em modificações de óleos e gorduras, devido a isso, encontrou diversas aplicações na indústria alimentícia (BOEL et al., 1988; NAGAOKA; YAMADA, 1973; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). A RML apresenta uma alta estabilidade em sistemas anidros, uma vantagem em relação as outras lipases (NOEL; COMBES, 2003; NOËL; LOZANO; COMBES, 2005). Estas vantagens, por sua vez, podem ser reforçadas devido a sua alta estabilidade de esterificação em meio anidro, o que torna a RML uma lipase de escolha principalmente em esterificações ou em reações que nas etapas iniciais prossiga via esterificação (RODRIGUES; FERNANDEZ-

LAFUENTE, 2010a). Além do setor alimentício, esta enzima pode ser utilizada desde a química fina até produção de biodiesel, principalmente em processos regio e enantiosseletivo ou específicos (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a).

### 3.2.2 Lipase A de *Candida antarctica* (CALA)

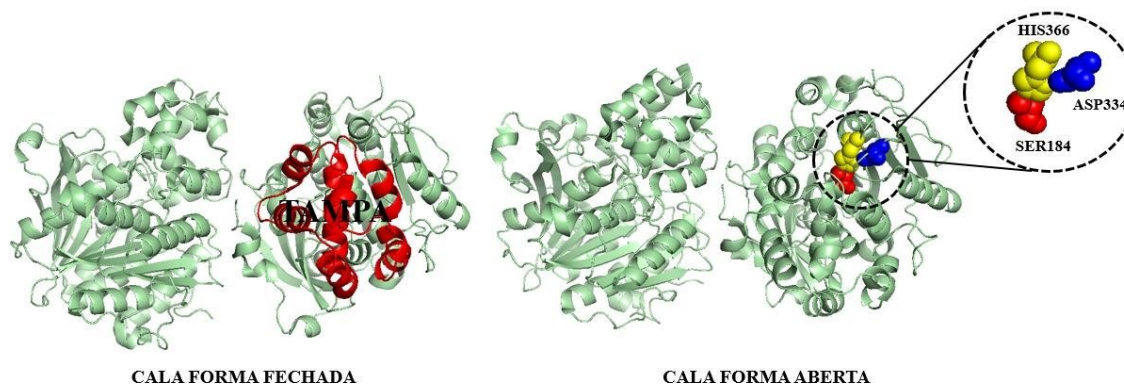
A levedura *Candida* sp. é o fornecedor de lipases mais proeminentes relatado na literatura (TREICHEL et al., 2010). A espécie *Candida antarctica* produz duas lipases distintas: lipase A de *Candida antarctica* e lipase B de *Candida antarctica* (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005).

A CALA é constituída por 431 aminoácidos, possui ponto isoelétrico (pI) de 7,5, massa molecular de 45 kDa, pode atuar em uma ampla faixa de pH, exibindo estabilidade em pHs ácidos, porém, o seu pH ótimo é 7,0 (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019). Ela apresenta uma alta estabilidade térmica, o que permite a lipase trabalhar de forma mais eficiente em temperaturas superiores a 90 °C, tornando a CALA uma das lipases mais termoestáveis (MONTEIRO et al., 2019b, 2021b).

A estrutura cristalina da CALA só foi publicada em 2008, por conta das divergências entre as sequências primárias da CALA e a semelhança existente com as esterases, algumas discussões sobre a inclusão da CALA na classe das lipases ocorreram, pois foi definido inicialmente que a CALA não apresentava uma tampa cobrindo o sítio ativo e o seu grau de ativação interfacial era modesto quando comparado as outras lipases (CHENG et al., 2018; ERICSSON et al., 2008; KASRAYAN et al., 2007; MARTINELLE; HOLMQUIST; HULT, 1995). Contudo, foi relatado na literatura que a CALA possuía uma tampa bem definida composta pela sequência de resíduos de aminoácidos (217 – 308), e uma tríade catalítica composta por SER184, ASP334 E HIS366, além de um domínio de hidrolases  $\alpha/\beta$  clássico (ERICSSON et al., 2008; OLLIS et al., 1992). A estrutura cristalina da CALA e os resíduos de aminoácidos presentes em seu sítio catalítico são apresentados na Figura 3.

**Figura 3** – Representação da estrutura 3D da lipase A de *Candida antarctica*: Conformação Fechada (código PDB: 3GUU); Conformação Aberta (código PDB: 3GUU) com resíduos da tríade catalítica SER184 (vermelho), ASP334 (azul), HIS366 (amarelo). Todas as estruturas 3D foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional.





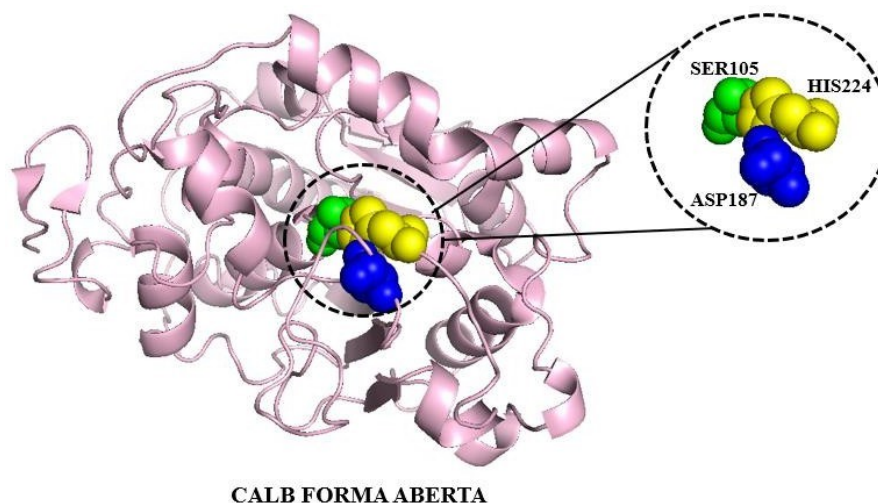
Fonte: Elaborado pela autora.

Essa lipase apresenta seletividade para ácidos graxos e uma elevada quimio-seletividade com relação aos grupos amina (ONDUL; DIZGE; ALBAYRAK, 2012). Além disso, a CALA demonstra atividade utilizando grandes substratos, como álcoois terciários volumosos e ésteres. É considerada uma das lipases capazes de catalisar a resolução cinética de álcoois terciários volumosos e estereotipados, sua atividade na formação de ligações amidas é bastante considerável (HARI KRISHNA; PERSSON; BORNSCHEUER, 2002; LIMA et al., 2019; LÖFGREN et al., 2019; MÄENPÄÄ; KANERVA; LILJEBLAD, 2016; ÖZDEMIRHAN, 2017; ÖZDEMIRHAN; SEZER; SÖNMEZ, 2008). Essa característica se deve a capacidade que a CALA possui para catalisar preferencialmente a transferência da acila de álcoois ou aminas ao invés da hidrólise, mesmo que seja em um meio aquoso volumoso (MÜLLER et al., 2014, 2015a, 2015b). Contudo, apesar dessas várias características, o uso da CALA tem sido bastante escasso (MONTEIRO et al., 2019a).

### 3.2.3 Lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

A lipase tipo B de *Candida antarctica* foi descrita e sequenciada geneticamente pela primeira vez no ano de 1994, pelo grupo de pesquisa de Uppenberg (UPPENBERG et al., 1994). A CALB possui estrutura globular constituída de 317 aminoácidos, massa molecular de 33 kDa, ponto isoelétrico (pI) de 6,0, além de se manter estável em uma ampla faixa de pH alcalino (7,0 – 10,0), contudo seu pH ótimo é 7,0 (STRZELCZYK et al., 2015). O seu sítio ativo é composto pelos resíduos de aminoácidos (SER105, ASP187 e HIS224), que formam a tríade catalítica. Um fato que diferencia a CALB das demais enzimas é o fato de seu sítio ativo não ser totalmente coberto, existe uma pequena hélice  $\alpha 5$  que poderia atuar como uma tampa (UPPENBERG et al., 1994). Na Figura 4 é apresentada a estrutura da CALB e seu sítio ativo.

**Figura 4** – Representação da estrutura 3D da lipase B de *Candida antarctica*: Conformação Aberta (código PDB: 1TCA) com resíduos da tríade catalítica SER105 (verde), ASP187 (azul), HIS224 (amarelo). Todas as estruturas 3D foram selecionadas do Protein Data Bank (PDB) usando pymol versão educacional.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

A CALB é um biocatalisador altamente regioselectivo, enantioselectivo, possui uma alta estabilidade e capacidade de atuação em uma ampla gama de reações orgânicas, incluindo aminólise, resoluções cinéticas, esterificação em meio sem solvente e em solventes polares (HASEGAWA; AZUMA; TAKAHASHI, 2008; LUND; BØCKMANN; JACOBSEN, 2016; MOUAD et al., 2016; RAVELO et al., 2015). Além de estar disponível comercialmente em sua forma livre e imobilizada (Novozyme 435), que é a lipase do tipo B de *Candida antarctica* imobilizada mais extensamente estudada, (imobilizada em resina acrílica) (MEI; KUMAR; GROSS, 2002). As enzimas imobilizadas apresentam uma eficiência catalítica melhor do que as enzimas livres e são capazes de suportar altas temperaturas (MATEO et al., 2007).

As lipases tendem a formar agregados bimoleculares (dímeros) quando expostas em um sistema aquoso homogêneo o que por sua vez reduz a atividade catalítica (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010a). A formação do agregado possuirá um centro ativo aberto, mas parcialmente bloqueado, o que implica na redução de algumas de suas propriedades bioquímicas como estabilidade, atividade e enantioselectividade (DE OLIVEIRA et al., 2018). A imobilização enzimática (imobilizar a enzima em um determinado suporte em sua conformação mais ativa) é um método

---

adequado para obter biocatalisadores com alta atividade catalítica (DE OLIVEIRA et al., 2018).

### **3.3 Imobilização de Enzimas**

A utilização de enzimas solúveis apresenta alguns problemas, como estabilidade moderada quando submetidas a condições severas de temperatura e pH, inibição pelo substrato e até mesmo pelo produto. Com isso, os protocolos de imobilização em suportes sólidos são vistos como uma solução eficiente para solucionar estes problemas (BETIGERI; NEAU, 2002; LERESCHE; MEYER, 2006; SIVA DEEPTHI et al., 2014).

Com a crescente aplicação de enzimas, os processos de imobilização enzimática estão sendo cada vez mais requisitados para aplicações industriais e biotecnológicas, pois permitem criar biocatalisadores resistentes que possam trabalhar em diferentes condições operacionais, com uma melhor estabilidade e atividade catalítica, além da capacidade de recuperação do biocatalisador, possibilitando seu uso em operações contínuas (BEZERRA et al., 2015; CACICEDO et al., 2019; SHELDON; WOODLEY, 2018). A imobilização enzimática é um processo em que moléculas enzimáticas são presas em um suporte sólido feito por um material diferente do substrato (REIS et al., 2019).

Contudo, o método de imobilização não significa necessariamente que ocorreu a estabilização da enzima no suporte (ZAITSEV; SAVINA; ZAITSEV, 2019). Se o protocolo de imobilização não for bem aplicado, para que não ocorra interações não controladas entre a enzima e o suporte, as enzimas solúveis podem apresentar melhor estabilidade operacional que as enzimas imobilizadas, por conta das mudanças conformacionais na sua estrutura, provocando a desnaturação da mesma (BARBOSA et al., 2013; GARCIA-GALAN et al., 2011). As enzimas imobilizadas devem apresentar atividade catalítica superiores as enzimas solúveis e não pode ocorrer alteração na posição do sítio catalítico e nem alterações estruturais das enzimas (CLAASSEN; GERLACH; ROTHER, 2019; ZAITSEV; SAVINA; ZAITSEV, 2019). Por isso, o protocolo de imobilização deve ser eficientemente avaliado buscando melhorar a atividade e a seletividade do biocatalisador (RODRIGUES et al., 2013). Os métodos de imobilização podem ser divididos basicamente em três categorias: ligação enzima-suporte; reticulação (cross-linking) e encapsulamento (suportes inertes). As interações que permitem ocorrer a ligação entre enzima e suporte podem variar desde a adsorção física reversível até

---

ligações iônicas e covalentes estáveis (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013).

O método de adsorção física é a estratégia mais utilizada para a imobilização de enzimas, é um método direto de imobilização reversível, ela promove uma ligação entre a enzima e o suporte, é um procedimento simples, barato e rápido, que promove uma alta atividade catalítica (BEZERRA et al., 2015; GARCIA-GALAN et al., 2011). Neste método, o biocatalisador é produzido pela adesão da enzima na superfície do suporte hidrofóbico, por meio de interações fracas ou forças de Van der Waals, ligação iônica e ligação de hidrogênio (STEPANKOVA et al., 2013). Como as ligações envolvidas são de natureza fraca é possível que ocorra a dessorção da enzima do suporte quando ocorrem variações nas condições do meio reacional (como variações da concentração de substratos, temperatura, pH, etc). Contudo, essa facilidade na dessorção pode apresentar uma vantagem, pois permite recuperar facilmente o suporte após a desnaturação da enzima (ROBINSON, 2015; SHELDON; VAN PELT, 2013).

A imobilização por ligação covalente ocorre por meio da ativação do suporte com a adição de grupos funcionais que reagem com os grupos nucleofílicos funcionais das enzimas os quais são ligados através de interações forte, intitulada ligações covalentes (CANTONE et al., 2013; RUEDA et al., 2016). Estas ligações são mais estáveis evitando que ocorra a dessorção entre a enzima e o suporte como acontece no método de adsorção. Por conta dessa forte ligação, o biocatalisador apresenta alta estabilidade às alterações que ocorrem no meio reacional (CANILHO et al., 2013; CANTONE et al., 2013).

O método de imobilização por reticulação (cross-linking), têm sido largamente explorado para melhorar as propriedades das enzimas (RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). Neste método são realizadas ligações cruzadas entre as moléculas da enzima por meio de um composto multifuncional como o glutaraldeído (SATAR et al., 2018). Nesta metodologia a enzima pode ser imobilizada por adsorção seguida do cross-linking entre as moléculas da enzima e do suporte, formando ligações fortes que ajudam a prevenir que ocorra a dessorção da enzima. Devido a essas múltiplas ligações, pode ser que ocorra a modificação conformacional da enzima, o que leva a alteração na atividade ou a sua total desnaturação (CACICEDO et al., 2019; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011).

---

O método de imobilização por encapsulamento, ocorre quando a enzima é aprisionada em uma cápsula polimérica (REIS et al., 2019). Este aprisionamento refere-se ao envolvimento da enzima na membrana ou na microcápsula semipermeável. Essas membranas ou cápsulas devem possuir pequenos poros, para que a passagem de produtos e substratos sejam livres, mas não podem permitir a passagem da enzima. Com isso, as enzimas permanecem no meio reacional, mas são protegidas de efeitos externos da reação (TAMER; OMER; HASSAN, 2016). O método apresenta a vantagem de não mudar a estrutura da enzima, porém, este método pode não ser aplicável em alguns casos, por exemplo, se o substrato for complexo ou muito grande pode ser que ele penetre os poros do material de encapsulamento da enzima (NGUYEN; KIM, 2017; TAMER; OMER; HASSAN, 2016).

A combinação dos métodos de imobilização é frequentemente aplicada visando melhorar a atividade e a estabilidade enzimática. Se houver mais de um alvo de interesse a metodologia de coimobilização pode ser aplicada (MATEO et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013). A coimobilização consiste em reter duas ou mais enzimas em uma mesma matriz ou ligadas entre si, formando sistemas multi-enzimáticos (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010; O'REILLY; SCOTT, 1995).

Geralmente a coimobilização é um método utilizado para enzimas que atuam em cooperatividade, produzindo sistemas que aumentam ou melhoram a eficiência catalítica de uma das enzimas pela formação do seu substrato, dessa forma, os processos que eram realizados em diversas etapas são executados em uma única etapa (KANG et al., 2014). Além disso, pode ser utilizado para eliminar subprodutos indesejados durante uma reação enzimática, na combinação de várias enzimas para a síntese de produtos, na produção de biossensores e reciclagem de cofatores (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010; DU et al., 2017; ZHANG; LIU; ZHENG, 2012). Deste modo, a produção de sistemas coimobilizados é bastante interessante no sentido econômico e ambiental (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010).

A preparação do protocolo de coimobilização envolve a imobilização em conjunto ou separada das enzimas no suporte selecionado, e também diferentes metodologias de imobilização (SCHOFFELEN; VAN HEST, 2013). Os métodos mais utilizados são: interações covalentes, hidrofóbicas ou iônicas e por aprisionamento em um suporte sólido. O mais empregado é o por ligação covalente utilizando o suporte

previamente ativado com agentes bifuncionais, como o glutaraldeído ou epóxido, e ligação dos grupos amino das enzimas (BABICH et al., 2012; FORNERA et al., 2012).

Nas metodologias de imobilização por adsorção a utilização de suportes de pequenas dimensões, por exemplo, as nanopartículas magnéticas são preferíveis, pois em superfícies extensas de imobilização podem deformar a estrutura da enzima, por conta da maior interação entre o suporte a enzima (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). No entanto, no método de imobilização por ligação covalente o tamanho da partícula não importa, pois vai depender do grau de ativação do suporte (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

Desde 1960 as enzimas livres e imobilizadas estão sendo utilizadas em escala industrial (GUISAN, 2006; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Com isso, os esforços da pesquisa estão voltados para o desenvolvimento e otimização de materiais que possam ser empregados como suportes para a imobilização enzimática (GUISAN, 2006; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). O suporte é o que mais afeta o desempenho da enzima após a imobilização. É onde ocorrem as ligações enzima-suporte, dessa forma, a estrutura química da matriz deve possuir grupos reativos que são capazes de favorecer a ligação da enzima e ser livre de impedimento estérico (MATEO et al., 2007).

Os suportes podem ser divididos em duas classes; orgânicos que são largamente utilizados uma vez que apresentam compatibilidade com as enzimas; e inorgânicos que são os mais empregados industrialmente devido a sua alta estabilidade térmica e resistência mecânica (DATTA; CHRISTENA; RAJARAM, 2013).

Dentre os suportes inorgânicos as nanopartículas magnéticas ganham destaque, pois possibilitam novas propriedades, como fácil recuperação com a aplicação de um campo magnético externo, elevada área superficial e uma boa resistência à temperatura e à agitação suporte (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). E entre os suportes inorgânicos a quitosana é a que apresenta um potencial crescente de aplicação em processos de imobilização (ADRIANO et al., 2008).

### ***3.3.1 Imobilização em Quitosana (QUI)***

A quitosana é um polímero natural que possui propriedades únicas, como biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade (AHMAD; MANZOOR; IKRAM, 2019; GZYRA-JAGIEŁA et al., 2019; KHADEMIAN et al., 2020). A quitosana tornou-se um biomaterial atraente para uso em diversas aplicações, por conta da sua relevância econômica e ambiental (SANTOS et al., 2020). Por ser um material de baixo

custo e renovável, a versatilidade da quitosana é considerada multidimensional, com possibilidade de aplicações em setores alimentícios, farmacêutica, biotecnologia, medicina entre outras (AFJEH et al., 2019; ISLAM; DMOUR; TAHA, 2019; MERZENDORFER; COHEN, 2019; MORIN-CRINI et al., 2019; QUIÑONES; PENICHE; PENICHE, 2018).

A quitosana é obtida a partir da desacetilação alcalina da quitina, encontradas em artrópodes e nas paredes celulares dos microorganismos (HAHN et al., 2020; SANTOS et al., 2020). Possui em sua estrutura molecular um grupo amino livre e hidroxilas primárias e secundárias, que podem ser modificadas quimicamente, proporcionando novas propriedades biológicas e mecânicas (LIZARDI-MENDOZA; ARGÜELLES MONAL; GOYCOOLEA VALENCIA, 2016; OU et al., 2018). A presença desses grupos amino permite que ocorra a síntese de diferentes derivados de quitosana (AKOPOVA et al., 2019).

O grau de desacetilação é um dos parâmetros químicos mais importantes, pois é capaz de influenciar o comportamento da quitosana em diversas aplicações (MATHABA; DARAMOLA, 2020). Para ser considerado quitosana é necessário possuir um grau de desacetilação entre 56 e 99% (YEUL; RAYALU, 2013). A partir das condições da reação de desacetilação como concentração, tipo de reagente, temperatura e tempo vão conferir a quitosana produzida propriedades físicas e químicas que determinarão as suas aplicações e a sua eficiência (TSAIH; CHEN, 2003).

Por conta das suas diversas propriedades a quitosana tem sido amplamente utilizada na produção de biocatalisadores homogêneos e heterogêneos, nos quais são utilizados como suporte para a imobilização enzimática (KOUACHI, 2012; VERMA et al., 2020). Na Tabela 1 são apresentados exemplos de enzimas imobilizadas em quitosana.

**Tabela 1** – Enzimas imobilizadas em quitosana.

<b>Suporte</b>	<b>Enzima/ Método de Imobilização</b>	<b>Condições Reacionais</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referências</b>
Partículas de Quitosana	CALB e RML/ Ligação Covalente	24 h, 25 °C, pH 7	Hidrólise de óleo de peixe	(URRUTIA et al., 2018)
CHI-GLY- EDA-GLU	CALB/Ligação Covalente	5 h, 25 °C, pH 10	Produção de Oleato de etila	(DOS SANTOS et al., 2017)

Nanopartículas de quitosana	Laccase Paraconiothyrium variabile/ Ligação Covalente	15 min, 40 °C, pH 5,	Biodegradação de poluentes ambientais	(SADIGHI; FARAMARZI, 2013)
Filme de Quitosana	Protease	12 h, 4 °C, pH 8	Aplicações médicas	(ELCHINGER et al., 2015)
Quitosana- Glutaraldeído	Lysozyme/ Ligação Covalente	2 h, 25 °C, pH 7	Atividade antimicrobiana em vinhos brancos	(LIBURDI et al., 2016)
Grânulos de Quitosana	Laccase from papaya/ Encapsulamento	8 h, 37 °C pH= 10	Biodegradação de poluentes ambientais	(JAISWAL; PANDEY; DWIVEDI, 2016)
Composto quitosana-sílica	$\beta$ -glucosidase/ / Ligação Covalente	2 h, 25 °C , pH 7	Hidrólise da Lactose	(RICARDI et al., 2018)
Grânulos de Quitosana	Laccase from the white-rot fungus Trametes pubescens/ Encapsulamento	96 h, 55 °C, pH 5	Biodegradação de poluentes ambientais	(MA et al., 2018)
Nanopartículas de quitosana- ouro	Organophosphorus hydrolases/ / Ligação Covalente	2 h, 25 °C, pH 6.5	Detecção de paraoxon	(KARAMI et al., 2016)
Grânulos de Quitosana	Horseradish peroxidase/ Aprisionamento	48 h	Biodegradação de poluentes ambientais	(BILAL et al., 2017)

Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.3.2 Imobilização em Nanopartículas Magnéticas (NPsM)

A separação dos biocatalisadores após os processos biocatalísticos é um dos principais desafios que necessitam ser solucionados para o processo de imobilização (BILAL et al., 2018). Com isso, a imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas, fornece uma separação fácil do meio reacional quando expostas a um campo magnético externo (LYU et al., 2019; ROSSI et al., 2014). Nos últimos anos, as nanopartículas magnéticas estão sendo cada vez mais utilizadas para a imobilização de enzimas por conta das suas diversas vantagens, como separação fácil e rápida da reação, alta estabilidade, baixa toxicidade, presença de grupos hidroxila em sua superfície, o que facilita a funcionalização e promove uma forte ligação entre a molécula da enzima e os



grupos do suporte (BILAL et al., 2018; LI et al., 2013; LYU et al., 2019) (Tabela 2). Outras características importantes para a otimização de um sistema catalítico com uma matriz enzimática estabilizada e que promove a redução dos obstáculos estéricos, são a baixa porosidade e a estabilidade mecânica excepcional (ABBASZAADEH et al., 2012; HUANG; LIAO; CHEN, 2003). Utilizar nanopartículas magnéticas como suporte enzimático apresenta uma abordagem eficaz da química verde, pois a vida útil do biocatalisador é prolongada, devido aos sucessivos ciclos de recuperação e demonstra uma ótima compatibilidade com o meio ambiente (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

**Tabela 2** – Lipases imobilizadas em nanopartículas magnéticas.

<b>Suporte</b>	<b>Reagente Funcional</b>	<b>Método de Imobilização</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referências</b>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub> fibroso mesoporoso oco SiO <sub>2</sub>	APTES	Ligação Covalente	Imobilização enzimática	(ALI et al., 2017)
GEAMNP	2,3 - Cloreto de epoxipropiltrimetilamônio	Troca aniônica e ligação covalente	Produção de Biodiesel	(LI et al., 2017b)
CA-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NPs	Ácido Cítrico	-	Imobilização enzimática	(LI et al., 2017a)
Nanopartículas magnéticas Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @SiO <sub>2</sub>	APTES, MPTMS	Glutaraldeído	Produção de Biodiesel	(THANGARAJ et al., 2019)
HM-CSL- CLEAs	Sulfato de amônia	Ligação Covalente	Biocatálise para a epoxidação de ácido oleico	(CUI et al., 2016)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @mSiO <sub>2</sub>	Persulfato de anilina e amônio	Ligação Covalente	Imobilização enzimática	(MAHTO et al., 2016)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @MCM- 41	APTS, CPS	Adsorção	Imobilização enzimática	(SHAO et al., 2015)
Nanopartícula magnética modificada de alquil silano	Trimetoxil octadecil silano	Interação hidrofóbica	Imobilização enzimática	(WANG et al., 2012)
PD-MNPs	Polidopamina	Ligação Covalente	Imobilização enzimática	(REN; LEE; PADOVAN, 2011)

---

BS-NSM	Benzenossulfonato de alquila	Adsorção	Imobilização enzimática	(PONVEL et al., 2009)
EDBE-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	PEI, EA, EDBE	Ligação Covalente	Imobilização enzimática	(SAHOO; DUTTA; DHARA, 2016)

---

**Fonte:** Elaborado pela autora.

A magnetita (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) é o suporte magnético mais utilizado, por conta da sua maior magnetização de saturação e susceptibilidade (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Contudo, quando apresenta um tamanho menor que 8 nm, a magnetita está mais vulnerável a sofrer o processo de oxidação produzindo misturas de óxidos com menores cristalinidade e resposta de magnetização (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; ROCA et al., 2007).

As nanopartículas possuem uma atração dipolar anisotrópica, por conta disso elas tendem a formar aglomerados, ocasionando a perda de suas propriedades específicas, por praticarem o fenômeno do monodomínio (MA; GUAN; LIU, 2006). Com isso, é necessário que ocorra a funcionalização da superfície com grupos orgânicos. Outra desvantagem é com relação ao óxido de ferro sem modificação superficial que é facilmente oxidado quando submetido a um sistema reacional biológico (MA; GUAN; LIU, 2006).

As interações superficiais entre as nanopartículas magnéticas e as enzimas são de extrema importância para que a imobilização possa ocorrer (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). A Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> pode ser utilizada no protocolo de imobilização sem realizar modificações prévias a sua superfície (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Contudo, a modificação superficial proporciona o controle entre os núcleos magnéticos e o ambiente ao qual a NPM é exposta, aprimorando a estabilidade e a reatividade do processo de imobilização (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013). Com isso, as NPMs geralmente necessitam de modificações na superfície para produzir imobilizações mais efetivas de acordo com a enzima e o protocolo de imobilização desejados, como ocorre com as maiorias dos suportes (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; SHELDON; VAN PELT, 2013). Assim, o recobrimento das nanopartículas magnéticas com materiais poliméricos pode aumentar a interação entre as enzimas e o suporte, além de proporcionar proteção a esse materiais, a fim de evitar processos oxidativos (LARRAZA et al., 2012).

### ***3.3.3 Recobrimento com 3-aminopropiltriétoxisilano***

O 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES), pertence à classe dos organosilano (BEZERRA et al., 2017; RIOS et al., 2016). A química dos organosilanos é bastante versátil, eles podem ser definidos como agentes de acoplamento, pois melhoram a adesão de materiais inorgânicos com orgânicos, lhe conferindo uma grande capacidade de adsorção, tornando o APTES atrativo para o recobrimento de nanopartículas magnéticas. O APTES se torna bastante promissor por apresentar dois grupos funcionais extremamente reativos; o grupo amino que representa a parte orgânica do organosilano e é responsável pelas ligações com outros compostos orgânicos e o grupo alcóxido que é responsável por realizar as ligações entre a superfície do substrato e os oligômeros. Geralmente trata-se de uma matriz inorgânica que possui hidroxilas em sua superfície (BEZERRA et al., 2017; MU et al., 2014). O APTES é largamente utilizado em conjunto com o glutaraldeído no processo de imobilização enzimática (BEZERRA et al., 2017; DE LATHOUDER et al., 2008; GUNDA et al., 2014; RIOS et al., 2016).

### ***3.3.4 Ativação com Glutaraldeído***

A ativação do suporte com glutaraldeído é uma das estratégias mais utilizadas para a imobilização de enzimas, é aplicada para fornecer ligações estáveis ao reagir com os grupos amins das enzimas, possibilitando a lavagem do suporte na presença de glutaraldeído (BETANCOR et al., 2006; MATEO et al., 2005). Apesar de produzirem ligações estáveis, a metodologia de ativação com glutaraldeído apresenta baixa estabilidade em pH alcalino, pois ocasiona uma elevada reatividade dos grupos funcionais tornando-os muito instáveis (DOS SANTOS et al., 2015b). Desta forma, as enzimas devem ser imobilizadas principalmente, por meio do grupo amino terminal (MATEO et al., 2005). O glutaraldeído é utilizado para ativar suportes aminados. Com isso, pode ocorrer que embaixo de cada molécula de glutaraldeído pode existir grupos amino que podem conceder algumas características de permutados iônico ao suporte, fazendo ser consideradas como matrizes heterofuncionais (BETANCOR et al., 2006).

### 3.4 Aplicações

#### 3.4.1 Biodiesel (*Ésteres etílicos de ácidos graxos*)

A versatilidade das lipases em reações de biotransformação é responsável pelo seu amplo uso na indústria de biocombustíveis derivados de biomassa, como biodiesel, biolubrificantes, entre outros (OKORO; SUN; BIRCH, 2019; SEKOAI et al., 2019). Neste contexto, devido à capacidade das lipases de catalisar reações de biotransformação, como esterificações (AGUIEIRAS et al., 2019), transesterificações (CHOI et al., 2018), acidólise e hidrólise (CHOJNACKA; GŁADKOWSKI, 2018), elas têm sido amplamente exploradas. Posto isso, inúmeros estudos desenvolvidos mostram que a síntese enzimática é capaz de atingir resultados promissores na produção de biocombustíveis (DUARTE et al., 2016).

O biodiesel é uma mistura de ésteres alquílicos de ácidos graxos que tem atraído a atenção mundial por ser um biocombustível renovável devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade, renovabilidade que pode ser obtida a partir de diferentes formas de ácidos graxos (CHEN et al., 2018; HAMA; NODA; KONDO, 2018). O biodiesel apresenta vantagens ambientais técnicas e estratégicas: pode reduzir a maioria das emissões de escapamento e possui lubricidade inerente (Haas et al., 2001; Rai et al., 2016). A produção de biodiesel usando lipases foi relatada pela primeira vez na literatura em 1990 por Mittelbach (MITTELBACH, 2015). Os principais atrativos para a produção enzimática de biodiesel são a versatilidade das lipases para catálise simultânea de ácidos graxos e triglicerídeos, redução do consumo de energia em reações com baixas temperaturas e pressão (HAMA; KONDO, 2013; SANKARAN; SHOW; CHANG, 2016). Devido ao seu potencial, diversos estudos sobre a produção enzimática de biodiesel estão sendo desenvolvidos (HAMA; NODA; KONDO, 2018). Nos últimos anos a indústria de biodiesel cresceu consideravelmente. Globalmente a indústria de biodiesel possuirá uma produção com uma expansão anual de 7,3% (SEKOAI et al., 2019).

Existem diversas sínteses para a produção de biodiesel, dentre elas a transesterificação utilizando catalisadores alcalis são as mais empregadas. A reação de transesterificação, consiste em um óleo vegetal ou gordura animal (triglicerídeos), que reage com um álcool de cadeia curta, geralmente metanol ou etanol, na presença de um catalisador, obtendo como produto principal o biodiesel e como coproduto a glicerina (SHAH, 2019; TUBINO; JUNIOR; BAUERFELDT, 2016).

A reação de esterificação é uma rota promissora, por conta da redução na produção de sabões e coprodutos durante o processo (CHOZHAVENDHAN et al., 2020; NISAR et al., 2017; TIAN et al., 2017). A reação de esterificação ocorre entre ácidos graxos livres (AGLs) oriundos de fontes lipídicas que reagem com um álcool de cadeia curta, por exemplo, etanol e metanol, na presença de um catalisador químico ou bioquímico, obtendo éster e água como subproduto (KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018; MOREIRA et al., 2020b).

Outra metodologia que pode ser realizada para a obtenção de biodiesel é a hidroesterificação (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Que consiste de um processo integrado que combina dois processos, hidrólise e esterificação, em reações sucessivas. Este processo pode ser realizado por meio da (I) hidroesterificação livre de catalisador (líquidos supercríticos), (II) hidroesterificação química/enzimática e (III) hidroesterificação enzimática (AGUIEIRAS et al., 2014). Esta metodologia surgiu como uma alternativa para resolver os problemas relacionados aos métodos convencionais de produção de biodiesel que utilizam matérias-primas com alta concentração de ácidos graxos livres e água, como gorduras animais, óleos residuais de cozinha e não comestíveis (MINAMI; SAKA, 2006; NGAOSUWAN et al., 2009).

A utilização de catalisadores básicos homogêneos na reação de transesterificação apresenta algumas desvantagens como a produção de sabões, alto teor de ácidos graxos livres, produção de glicerina e o catalisador não pode ser reutilizado (BABAKI et al., 2017; CHOZHAVENDHAN et al., 2020; MOREIRA et al., 2020b). No caso das reações catalisadas por ácidos, as desvantagens são com relação a baixa seletividade, produz ácidos residuais, problemas de corrosão, que podem causar grandes danos ao meio ambiente (AGUIEIRAS et al., 2014; AMINI et al., 2017; MOREIRA et al., 2020b). Posto isso, a reação de esterificação consome menos energia (por ser um processo mais rápido), não ocorre a contaminação do biodiesel por resíduos de glicerina, o que dispensa a etapa de lavagem e produção de efluentes como ocorre na reação de transesterificação (BAJAJ et al., 2010; BERGTHORSON et al., 2011; MOREIRA et al., 2020b; YAN; YAN, 2017).

### **3.4.2 Haloidrinas**

As halohidrinás são consideradas uma das mais importantes classes de compostos orgânicos empregados como intermediários na síntese de várias substâncias bioativas de alto valor agregado (KARIMI ZARCHI; TARABSAZ, 2013; PINTO;

---

SALVADOR; LE ROUX, 2007; SURENDRA et al., 2005; YADAV et al., 2004; ZHANG et al., 2011). Um dos protocolos mais utilizados na preparação de halohidrinas é a abertura do anel de epóxidos na presença de haletos de hidrogênio ou ácidos hidrohalogênicos. Contudo, esse processo apresenta algumas desvantagens, como a formação de subprodutos e a intolerância de grupos sensíveis aos ácidos, dessa forma foi necessário desenvolver novos procedimentos mais ecológicos e eficazes (KARIMI ZARCHI; TARABSAZ, 2013; PINTO; SALVADOR; LE ROUX, 2007; SURENDRA et al., 2005; YADAV et al., 2004; ZHANG et al., 2011).

A utilização de biocatalisadores é uma ferramenta alternativa aos processos químicos convencionais para a produção de halohidrinas quirais (DWIVEDEE et al., 2015; LIMA et al., 2017; LUND; BØCKMANN; JACOBSEN, 2016). A utilização de lipases no processo de resolução de racematos deve-se principalmente as suas características de enatio-, quimio- e regioselectividade, sem a utilização de cofatores (FONSECA et al., 2020b). Além disso, as lipases normalmente apresentam excelente estabilidade na presença de solventes orgânicos, facilitando a solubilização do substrato orgânico a ser modificado (CARVALHO et al., 2015; FERREIRA et al., 2017; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTOR, 2006). É importante ressaltar que as lipases catalisam ambos os processos de resolução cinética, tanto a acetilação de halohidrinas quanto a hidrólise dos ésteres correspondentes (FERREIRA et al., 2017; FONSECA et al., 2018; KIM et al., 2001; LIMA et al., 2017; LIU; HOFF; ANTHONSEN, 2000; LUND; BØCKMANN; JACOBSEN, 2016).

### **3.5 Planejamento Experimental**

Tanto na indústria quanto na pesquisa sempre existirá um interesse em obter o maior rendimento possível de uma determinada reação (AKINTUNDE; AJALA; BETIKU, 2015). Partindo do ponto em que essa reação venha a ser controlada por alguns fatores (variáveis do sistema) e que esses fatores influenciam no rendimento (variável resposta), essas variáveis podem ser testadas em diferentes níveis, a fim de saber a influências dessas variáveis do sistema sobre a variável resposta (AKINTUNDE; AJALA; BETIKU, 2015). Com a utilização de planejamentos experimentais, pode ser extraído o máximo de informações úteis possíveis do sistema em estudo (AKINTUNDE; AJALA; BETIKU, 2015).

### 3.5.1 Método Taguchi

O método Taguchi é utilizado na otimização e análise de efeitos de parâmetros de forma muito eficaz (ZHANG et al., 2019). Ele ganha destaque quando comparado aos outros modelos experimentais mais tradicionais, por necessitar de menor tempo e recursos (ZHANG et al., 2019). O Taguchi utiliza um arranjo ortogonal apropriado de modo que permite reduzir a maioria dos cálculos e demonstrar claramente a influência de cada um dos fatores no parâmetro desejado, com a execução de menos experimentos (EL KHALIDI et al., 2018).

O método consiste em utilizar a relação sinal/ruído (S/R) para medir a variabilidade de desempenho, enquanto a Análise de Variância (ANOVA) avalia a importância relativa de cada fator (PETERSEN; LINK; RUSHFORTH, 2009). O valor da razão S/R é calculada de a partir da Equação 1 (PETERSEN; LINK; RUSHFORTH, 2009).

$$S/R = -10 \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 1/y_i^2 \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Em que,  $y_i$  representa as variáveis de resposta,  $i$  sendo o número de repetições e  $n$  representando o número de experimentos para a combinação de níveis de fator para qualquer combinação de planejamento. A relação S/R prevista em condições ideais podem ser estimadas pela Equação 2 (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$S/R_{previsto} = S/R + \sum_{j=1}^n (S/R_j - S/R) \quad (2)$$

Em que,  $S/R$  é a média aritmética de todas as razões S/R,  $S/R_j$  é a razão S/R no ponto ótimo para cada fator e  $n$  é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

### 3.6 Docking Molecular

As informações disponíveis sobre a atividade biológica, inibição e estruturas enzimáticas cresceram consideravelmente ao longo dos anos. Banco de dados estruturais como por exemplo o Protein Data Bank (PDB) possuem uma grande quantidade de informações sobre a estrutura cristalina das enzimas (DIAS; DE AZEVEDO JR., 2008).

O *docking* molecular também conhecido como ancoragem ou docagem molecular é um método de modelagem molecular que analisa a predição das estruturas dos complexos receptor-ligante. Essa metodologia é importante, pois através do *docking*

---

molecular é possível determinar as conformações mais adequadas de um ligante ancorado a um determinado alvo. O objetivo desse método é prever a ligação e a afinidade entre o ligante e a macromolécula. Devendo ser capaz de apresentar corretamente o posicionamento do ligante no sítio ativo (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006).



## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### ETAPA 1 - Lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em nanopartículas magnéticas: desempenho em produção otimizada de éster etílico de ácido graxo pelo método de Taguchi

#### 4.1 Materiais

O extrato comercial da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) (5,9 mg de proteína/mL) foi gentilmente doado pela Novozymes (Espanha). O 3-aminopropiltrióxissilano (APTES), a solução de glutaraldeído grau II 25% (p/v), o butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) e o Triton X-100, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, EUA); etanol (P.A. 99,96%) da Dinâmica (São Paulo, Brasil). As Nanopartículas magnéticas de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) foram produzidas pelo método de coprecipitação. Os reagentes químicos utilizados para esta síntese foram  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (granulado puro 99%),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (granulado puro 99%) e solução de amônia 30%, fornecida pela Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MI, EUA). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de qualidade analítica. O planejamento experimental foi realizado pelo método Taguchi, utilizando o software Statistica® 10 (Statsoft, EUA).

#### 4.2 Métodos

##### 4.2.1 Síntese de nanopartículas magnéticas de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) funcionalizadas com 3-aminopropiltrióxissilano (APTES)

As nanopartículas magnéticas (NPsM) funcionalizadas com APTES foram produzidas seguindo a metodologia descrita por (MONTEIRO et al., 2019a). Em 30 mL de água deionizada foram dissolvidos 2,5 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (9 mmol) e 4,0 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (15 mmol), sob agitação mecânica por 30 min a 60 °C, 40 mL de hidróxido de amônio concentrado foram adicionados à solução de cátions de ferro. O sistema permaneceu sob agitação mecânica à temperatura de 60 °C por 30 min. Decorrido esse tempo, as nanopartículas foram lavadas várias vezes com água deionizada e três vezes com etanol. Posteriormente, as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  não funcionalizadas foram colocadas em 300 mL de etanol (95%) e mantidas em banho ultrassônico (37 kHz e 300 W) por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 10 mL de APTES à mistura. O sistema permaneceu por mais uma hora no banho ultrassônico e após esse tempo, as nanopartículas funcionalizadas foram lavadas quatro vezes com etanol e secas a vácuo (MONTEIRO et al., 2019a). As nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTES foram denominadas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES.

#### 4.2.2 Ativação de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES com glutaraldeído (GLU)

As nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES foram ativadas com glutaraldeído (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU), para fornecer à ligação covalente entre a enzima e o suporte. Para isso, 0,1 g de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES previamente seco foi colocado em contato com 100 µL de glutaraldeído. A mistura permaneceu sob agitação constante durante 1 hora a 25 °C. Em seguida, a mistura foi lavada 3 vezes com solução tampão de fosfato de sódio (25 mM e pH 7) para remover o glutaraldeído em excesso (MONTEIRO et al., 2019a; XIE; MA, 2009b).

#### 4.2.3 Imobilização covalente de RML em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU

A lipase de *Rhizomucor miehei* foi imobilizada em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU, denominado Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU-RML, por ligação covalente. Para isso, 0,1g de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU foram suspensos em 1 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM; pH 7) contendo RML (carga enzimática: 10 mg/g de suporte) na presença de Triton X-100 0,01%. O sistema foi colocado sob agitação constante durante 1h a 25 °C. Após esse tempo, o biocatalisador foi separado da solução por decantação magnética e lavado com solução tampão de fosfato de sódio (25 mM; pH 7) até a neutralidade. Para determinar a quantidade de enzima imobilizada no suporte, foi medida a concentração inicial e final de RML no sobrenadante da suspensão de imobilização (BEZERRA et al., 2017; MONTEIRO et al., 2019a). A concentração de proteína foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976) e albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976). Para a redução das bases de Schiff, após a etapa de imobilização da enzima, foi adicionado 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> de borohidreto de sódio à suspensão de imobilização e mantida sob agitação por 30 min a 25 °C. Depois disso, o derivado foi filtrado e bem enxaguado com tampão fosfato de sódio (0,2 M; pH 7,0) e finalmente lavado minuciosamente com água destilada (MENDES et al., 2011a).

#### 4.2.4 Imobilização por adsorção de RML em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES

A lipase de *Rhizomucor miehei* foi imobilizada em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES, denominado Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-RML (RML-NPM), por adsorção. Para isso, 0,1g de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES foram suspensos em 1 mL de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM; pH 7) contendo RML (carga enzimática: 10 mg/g de suporte) (MONTEIRO et al., 2019a). O sistema foi colocado sob agitação constante durante 1h a 25 °C. Após esse

tempo, o biocatalisador foi separado da solução por decantação magnética e lavado com solução tampão de fosfato de sódio (25 mM; pH 7) até a neutralidade. Para determinar a quantidade de enzima imobilizada no suporte, foi medida a concentração inicial e final de RML no sobrenadante da suspensão de imobilização (BEZERRA et al., 2017; MONTEIRO et al., 2019a). A concentração de proteína foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976) e albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976).

#### **4.2.5 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína**

A atividade hidrolítica da RML solúvel e imobilizada foi realizada seguindo a metodologia descrita por (RIOS et al., 2016). A atividade da lipase foi determinada pelo aumento da absorbância em 348 nm produzida pela hidrólise da solução do butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB 50 mM em acetonitrila), como substrato durante 90 s, sob agitação magnética. As análises foram realizadas em solução tampão de fosfato de sódio pH 7 (25 mM) a 25 °C ( $\epsilon$  nessas condições é  $5150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) (DE SOUZA et al., 2016). Para iniciar a reação, 50  $\mu\text{L}$  da solução de lipase suspensa foram adicionados a 50  $\mu\text{L}$  de *p*-NPB e 2,5 mL da solução tampão. Nessas condições, uma unidade internacional de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-NPB por minuto. A concentração de proteína foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976) e albumina de soro bovino foi usada como referência (BRADFORD, 1976).

#### **4.2.6 Parâmetros de imobilização**

Os parâmetros de imobilização foram avaliados de acordo com a metodologia descrita por (PINHEIRO et al., 2019). O rendimento de imobilização (RI) foi definido como a porcentagem da atividade enzimática que foi imobilizada, ou seja, a relação entre a atividade das enzimas retidas no suporte (atividade inicial - atividade final) dividida pela atividade inicial. A atividade teórica ( $A_{T}$ ) da lipase imobilizada no suporte pode ser calculada a partir da quantidade de enzima oferecida por g suporte e do rendimento de imobilização (DOS SANTOS et al., 2017). E a atividade recuperada ou expressa ( $A_{R}$ ) foi definida como a razão entre a atividade do biocatalisador ( $A_{D}$ ) e a atividade teórica ( $A_{T}$ ).

#### **4.2.7 Caracterização dos materiais obtidos**

Os padrões de difração de pó de raios-X (XRPD) das nanopartículas sintetizadas foram coletados usando um difratômetro Bruker D2 Phaser, controlado por um software de medição, um difrato operando a 30 kV e 10 mA na geometria de reflexão Bragg-Brentano com radiação  $\text{CoK}\alpha$  ( $\lambda = 1.7880 \text{ \AA}$ ) usando uma faixa de  $2\theta$   $20^\circ - 90^\circ$  e uma taxa de varredura de  $2^\circ \text{ min}^{-1}$ . As etapas de funcionalização, modificação química do suporte e o processo de imobilização de todas as amostras foram realizadas por espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos para amostras secas (prensadas em pellet KBr em forma de disco) na faixa de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  usando um espectrofotômetro Perkin Elmer 2000.

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (MET) do biocatalisador foram obtidas usando um sistema Hitachi® HT7700 MET operando a uma tensão de aceleração de 120 kV. A fim de realizar a investigação MET, os nanomateriais foram primeiramente dispersos em etanol e depositados em um suporte de amostra de grade de cobre revestido de carbono. As curvas magnéticas foram obtidas utilizando um magnetômetro de amostra vibratória (VSM) a 300 K. Para garantir os valores dos momentos magnéticos adquiridos, o VSM foi previamente calibrado utilizando um material de referência padrão (ítrio Ferro Garnet Sphere) do National Institute of Standards e Tecnologia (NIST). Para todas as medições, o momento magnético obtido para cada campo aplicado foi normalizado pela massa das nanopartículas.

#### **4.2.8 Efeito do pH na atividade do biocatalisador**

Para analisar o efeito do pH na atividade do biocatalisador, a lipase livre e imobilizada foram ressuspensas em 1 mL de tampão 25 mM na faixa de pH entre 5 e 10 (acetato de sódio (faixa de pH 3,6 - 5,6), fosfato de sódio (pH intervalo 5,8 - 8,0) e carbonato de sódio (intervalo de pH 8,9 - 10,8)). A atividade foi medida utilizando a solução de *p*-NPB conforme descrito anteriormente. A enzima foi incubada em cada tampão por 15 min, e então a atividade foi medida (MONTEIRO et al., 2019b).

#### **4.2.9 Estabilidade térmica**

A estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada foi determinada por incubação em tampão de acetato de sódio (25 mM; pH 5), tampão de fosfato de sódio (25 mM; pH 7) e tampão de carbonato de sódio (25 mM; pH 10), a uma temperatura de  $60^\circ\text{C}$ . A atividade das amostras foi medida periodicamente usando *p*-NPB e tampão de

fosfato de sódio (25 mM; pH 7), a atividade residual foi expressa como uma porcentagem da atividade inicial (atividade hidrolítica antes da incubação térmica) (FERNANDEZ-LOPEZ et al., 2017).

#### 4.2.10 Produção de ácidos graxos livres (AGLs) a partir do óleo de babaçu

Os ácidos graxos livres (AGLs) do óleo de babaçu foram obtidos segundo (MULINARI et al., 2017), com algumas modificações. Para isso, uma solução etanólica de KOH (6: 1, álcool/óleo) foi adicionado a 100 g de óleo de babaçu residual, a reação foi aquecida a 80°C, por 1h, sob agitação mecânica constante. A reação ocorreu em um sistema formado por um condensador acoplado a um frasco de reação de fundo redondo de 500 mL suspenso acima de um tanque de água. No final da reação, a mistura foi transferida para um funil de separação e lavada com solução de HCl 6 M até pH 2,0. A fase oleosa superior foi lavada com água destilada até pH neutro (MULINARI et al., 2017).

#### 4.2.11 Otimização da produção de éster etílico de ácido graxo

A produção do éster etílico de ácidos graxos foi realizada em frasco de 10 mL em agitador rotativo com controle digital de temperatura e agitação (Incubadora TE-4200) a 200 rpm. A esterificação foi realizada utilizando-se os (AGLs) obtidos da hidrólise do óleo de babaçu residual e álcool etílico, com relação molar de 1:1 a 1:5 (AGLs/ álcool). A reação foi iniciada pela adição do biocatalisador de 1 a 9% (RML-NPM), sob uma temperatura variando de 30 - 50 °C e tempo de 2 – 6h. Após o tempo de reação específico para cada experimento, o índice de acidez foi determinado. Assim, alíquotas de 0,3 g foram retiradas do volume do sobrenadante da reação, diluídas em 7,5 mL de álcool etílico e adicionadas 3 gotas de fenolftaleína e então tituladas com a solução de hidróxido de sódio (0,1 M) (AGUIEIRAS et al., 2017; MUANRUKSA; KAEWKANNETRA, 2020). O índice de acidez (IA) foi determinado de acordo com a Equação 3 (CAVALCANTI et al., 2018).

$$AI(mgNaOH/g) = \frac{MM_{NaOH} \cdot M_{NaOH} \cdot f \cdot V_{NaOH}}{m} \quad (3)$$

Em que,  $MM_{NaOH}$  (g /mol) é a massa molar de NaOH;  $M_{NaOH}$  (mol /L) é a molaridade da solução de NaOH;  $f$  é o fator de correção determinado pela padronização de NaOH;  $V_{NaOH}$  (mL) é o volume de NaOH gasto na titulação; e,  $m$  (g) é a massa da

amostra a ser analisada. A conversão dos (AGLs) em ésteres foi calculada considerando a acidez da amostra sem biocatalisador (IA) e da amostra contendo o biocatalisador (IA), Equação (4) (CAVALCANTI et al., 2018).

$$\text{Conversão AGL(\%)} = \left( \frac{IA_B - IA_S}{IA_B} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

#### 4.2.12 Planejamento experimental e análise estatística (Método Taguchi)

Para este estudo, um projeto experimental avançado pelo método de Taguchi com uma matriz ortogonal padrão L9 (L representa o quadrado latino e 9 o número de experimentos) foi usado para examinar quatro fatores em três níveis a fim de otimizar a produção de éster etílico de ácido graxo. A Tabela 3 mostra os quatro fatores independentes (biocatalisador, razão molar, temperatura e tempo) e seus níveis correspondentes.

**Tabela 3** - Fatores independentes e seus respectivos níveis do projeto experimental para a produção dos ésteres etílicos de ácidos graxos.

	Temperatura (°C)	Tempo (horas)	Razão Molar (AGLs/álcool)	Biocatalisador (% m/m)
Nível 1 (L1)	30	2	1:1	1
Nível 2 (L2)	40	4	1:3	5
Nível 3 (L3)	50	6	1:5	9

Fonte: Elaborado pela autora.

O software Statistica® 10 foi utilizado para o desenho experimental e análise estatística. A Tabela 7 na seção de resultados e discussão apresenta o desenho experimental junto com as conversões e relações S/R (sinal-ruído) calculadas. Os valores das relações S/R correspondentes aos valores das conversões foram calculados a partir das características da função “maior é melhor”, visto que o objetivo deste estudo é maximizar a resposta (conversão). O valor da razão S/R para cada experimento foi calculado de acordo com a Equação 5.

$$S/R = -10 \log \left( \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n 1/y_i^2 \right) \cdot 100 \quad (5)$$

Em que,  $y_i$  representa as variáveis de resposta,  $i$  sendo o número de repetições e  $n$  representando o número de experimentos para a combinação de níveis de fator para qualquer combinação de planejamento. Por meio da Equação 6, foi possível determinar a relação S/R esperada para as condições ideais de obtenção da conversão máxima prevista (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$S/R_{previsto} = S/R + \sum_{j=1}^n (S/R_j - S/R) \quad (6)$$

Em que,  $S/R$  é a média aritmética de todas as razões S/R,  $S/R_j$  é a razão S/R no ponto ótimo para cada fator e  $n$  é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

#### 4.2.13 Análise de cromatografia gasosa (CG)

A conversão dos ésteres etílicos foi realizada de acordo com a norma EN 14103, com algumas modificações. Aproximadamente 50 mg de biodiesel foram pesados em um frasco de 2 ml, e 1 ml da solução de nonadecanoato de metila (10 mg/ml) foi adicionado. Um microlitro da amostra foi retirado com uma seringa (10  $\mu$ L) e injetado no cromatógrafo a gás (VARIAN-GC 450) com detector de ionização por chama, coluna (DB-WAX) - fase: polietilenoglicol, dimensões 60 m de comprimento  $\times$  0,32 mm diâmetro interno  $\times$  0,25  $\mu$ m de espessura do filme (MOREIRA et al., 2020b).

### ETAPA 2 – Coimobilização das Lipases A e B de *Candida antarctica* em quitosana otimizado pelo método de Taguchi: Caracterização, aplicação de resolução cinética e estudos de *docking* molecular

#### 4.3 Materiais

O extrato comercial das lipases A (19,46 mg de proteína/mL) e B (15,85 mg de proteína/mL) de *Candida antarctica* foram gentilmente doadas pela Novozymes (Espanha). A quitosana em pó, a solução de glutaraldeído grau II 25% (p/v), o butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) e o Triton X-100, foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St Louis, MI, EUA). Todos os outros reagentes químicos utilizados foram de grau analítico da Synth (São Paulo, Brasil) e Vetec (São Paulo, Brasil). Para a elaboração do planejamento experimental pelo o método Taguchi, foi utilizado o software Statistica® 10 (Statsoft, EUA).

## 4.4 Métodos

### 4.4.1 Preparação da Quitosana (QUI)

O gel de quitosana (2,5% m/v) foi preparado de acordo com a metodologia descrita por (ADRIANO et al., 2005), com algumas modificações. Primeiramente, 5 g de quitosana foram dissolvidos em uma solução de ácido acético 5% sob agitação magnética por 1 hora. Depois disso, a solução foi gotejada em 4 L de NaOH 0,1 M (v/v) e mantida sob agitação por 24 h a 25 °C. O suporte foi filtrado e lavado com água destilada até atingir a neutralidade, o que pode ser verificado utilizando a fenolftaleína como indicador (PINHEIRO et al., 2019).

### 4.4.2 Ativação da quitosana com glutaraldeído (GLU)

Para realizar as ligações covalentes entre a enzima e o suporte, a quitosana foi ativada com glutaraldeído (QUI-GLU), seguindo a metodologia descrita por (DOS SANTOS et al., 2015c), com algumas modificações. Para isso, 1,0 g de quitosana seca foi colocada na presença da solução de tampão fosfato de sódio 25 mM a pH 7,0 contendo 5% (v/v) de glutaraldeído, na temperatura de 25 °C, por 2 h (PINHEIRO et al., 2019).

### 4.4.3 Otimização da imobilização da lipase A de *Candida antarctica* (CALA) e da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em Quitosana (QUI)

Para realizar este estudo, um projeto experimental avançado pelo o método Taguchi que possui uma matriz ortogonal padrão L9, no qual “L” representa o quadrado latino e “9” o número de experimentos, foi utilizado para investigar quatro fatores (tempo, força iônica, pH e concentração de proteína) em três níveis. Com a finalidade de otimizar a imobilização simultânea da lipase A e B de *Candida antarctica* (CALA) e (CALB) em quitosana, abreviadamente, CALA-CALB-QUI, pelo o método de multicomponente, com diferentes proporções de CALA:CALB (1:1, 1:3 e 1:5). Para isso, 0,1g de QUI foram suspensos em 1mL de tampão com variação na força iônica (5, 50 e 100 mM) e pH (acetato de sódio, fosfato de sódio ou carbonato de sódio, 5-9), contendo uma concentração de proteína CALA:CALB (carga de enzima: 2,4 e 6 mg / g de suporte), na presença de Triton X-100 0,01%. O sistema foi mantido sob agitação moderada constante durante 1-24 h a 25 °C. Finalmente, as lipases imobilizadas foram separadas por decantação, lavadas com excesso de água destilada até a neutralidade, secas a vácuo e armazenadas na temperatura de 5 °C.



Na Tabela 4 é apresentado os quatro fatores independentes (tempo, força iônica, pH e concentração de proteína) e seus níveis correspondentes.

**Tabela 4** - Fatores independentes e seus respectivos níveis de imobilização para CALA-CALB-QUI.

	<b>Tempo (h)</b>	<b>Força Iônica (mM)</b>	<b>pH</b>	<b>Concentração de Proteína (mg/g)</b>
<b>Nível 1 (L1)</b>	1	5	5	2:1
<b>Nível 2 (L2)</b>	12,5	50	7	4:1
<b>Nível 3 (L3)</b>	24	100	9	6:1

Fonte: Elaborado pela autora.

Para realizar o desenho experimental e a análise estatística foi utilizado o software Statistica® 10 (Statsoft, EUA). A Tabela 10 que se encontra na seção de resultados e discussão apresenta o desenho experimental, o resultado do valor da atividade do biocatalisador e as razões S/R (sinal/ruído). Para calcular os valores das relações S/R que correspondem aos valores da atividade do biocatalisador foi utilizado a função “maior melhor”, visto que o objetivo do estudo é o de maximizar a variável resposta (atividade do biocatalisador). Para realizar o cálculo das razões S/R para cada experimento foi utilizado a Equação 5. Através da Equação 6, foi possível determinar a relação S/R esperada para as condições ideais para o processo de obtenção da atividade do biocatalisador (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

#### **4.4.4 Determinação da atividade enzimática e concentração de proteína**

A atividade hidrolítica das enzimas CALA:CALB solúvel e imobilizada foi determinada seguindo a metodologia descrita por (RIOS et al., 2016). A leitura da atividade foi realizada através da hidrólise do *p*-nitrofenila butirato (*p*-NPB 50 mM em acetonitrila), como substrato durante 90 s, sob agitação magnética; a concentração de *p*-nitrofenila butirato foi quantificada pelo aumento da absorvância espectrofotometricamente a 348 nm. As medições da atividade foram realizadas em solução tampão de fosfato de sódio pH 7 (25 mM) a 25 °C ( $\epsilon$  nessas condições é 5150 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (DE SOUZA et al., 2016; MONTEIRO et al., 2019b). Para o início da reação 50  $\mu$ L da solução de lipase suspensa foram adicionados a 50  $\mu$ L de *p*-NPB e 2,5 mL da solução tampão. Nessas condições, uma unidade internacional de atividade (U) foi

definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1  $\mu\text{mol}$  de p-NPB por minuto. A concentração de proteína foi determinada usando o método descrito por Bradford (1976) e albumina de soro bovino foi utilizada como referência (BRADFORD, 1976).

#### **4.4.5 Parâmetros de Imobilização**

Para analisar o desempenho da estratégia de imobilização os parâmetros de imobilização foram determinados de acordo com a metodologia descrita por (PINHEIRO et al., 2019). Em resumo, o rendimento de imobilização (RI) foi determinado como a porcentagem da atividade enzimática presente no sobrenadante antes e depois de um determinado período. É importante ressaltar que essa estratégia só é válida se a atividade de referência permanecer durante o tempo de imobilização, como foi o que ocorreu no presente estudo. A atividade teórica ( $A_{T_T}$ ) da enzima imobilizada foi calculada utilizando o rendimento de imobilização (RI) e a carga de proteína oferecida por g de suporte (DOS SANTOS et al., 2017). E a atividade recuperada ( $A_{T_R}$ ) foi determinada como a razão entre a atividade do biocatalisador ( $A_{T_D}$ ) e a atividade teórica ( $A_{T_T}$ ) (PINHEIRO et al., 2019; SILVA et al., 2012).

#### **4.4.6 Capacidade de carga de QUI para CALA:CALB**

A capacidade de carga do suporte foi investigada para a imobilização de CALA:CALB. Para isso, 10 mg de QUI foram suspensas em 1 mL de solução tampão carbonato de sódio (5 mM e pH 9) contendo CALA:CALB (carga de enzima: 1, 2, 3, 5, 6, 10, 13, 15, 20, 25, 30 e 40 mg de enzima /por g de suporte). O sistema foi mantido sob agitação constante por 1 hora a 25°C (DE SOUZA et al., 2016).

#### **4.4.7 Efeito do pH na imobilização**

Para avaliar o efeito do pH na atividade da mistura de enzima solúvel e da imobilizada, CALA:CALB e CALA-CALB-QUI foram suspensos em 1 mL de diferentes tampões (pH 4-9, 5mM). Para realizar a leitura da atividade foi utilizado o p-NPB, segundo descrito anteriormente, utilizando tampões com pH variando na faixa de 4 a 9. (acetato de sódio, fosfato de sódio ou carbonato de sódio). A atividade foi medida no tempo 0 min e após 30 min.

#### 4.4.8 Desativação Térmica

CALA:CALB e CALA:CALB-QUI foram incubadas em tampão carbonato de sódio (5mM; pH 9) a 50, 60, 70 e 80 °C por 24 horas. A atividade foi medida periodicamente utilizando  $p$ -NPB conforme descrito anteriormente e a atividade residual foi expressa como porcentagem da atividade inicial. Para a desativação da mistura de enzima solúvel e imobilizada foi seguido uma cinética de primeira ordem, de acordo com a Equação 7.

$$\ln \frac{[E]}{[E_0]} = -k_d t \quad (7)$$

No qual,  $[E]$  é a concentração da enzima ativa,  $[E_0]$  é a concentração da enzima ativa inicialmente presente no sobrenadante e  $k_d$  é a constante da taxa de desativação térmica ( $\text{hora}^{-1}$ ). Ao plotar um gráfico de  $(\ln \frac{[E]}{[E_0]})$  versus  $t$ , a inclinação fornece o valor da constante de desativação térmica. A meia-vida (horas), que pode ser definida como o tempo necessário para que os biocatalisadores percam metade de sua atividade inicial, é fornecida pela Equação 8.

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} = \frac{0,693}{k_d} \quad (8)$$

#### 4.4.9 Caracterização dos materiais obtidos

Os espectros de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foram obtidos em um espectrofotômetro Perkin-Elmer 2000 com uma faixa de número de onda entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram previamente secas para remoção da absorção de água e dispersas em KBr na proporção de 1:10. Posteriormente, foram moldados em pelotas translúcidas com o auxílio de uma prensa hidráulica. As medidas de difração de raio-X em pó (XRPD) foram realizadas à temperatura ambiente, em difratômetro Bruker (D8 Advance), com tubo  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ), equipado com detector linear LynxEye: voltagem de 40 kV e 40 mA corrente em uma faixa de varredura  $2\theta = 5 - 80^\circ$  e uma etapa de 0,02.

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada na faixa de temperatura de 25 a 900 °C, com rampa de aquecimento de 10 °C /min em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL /min. Para isso foi utilizado um equipamento Perkin Elmer, modelo STA 6000 Simultaneous Thermal Analyze. As imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e o mapa elementar por energia dispersiva (EDS) foram realizados para avaliação

da morfologia e composição química. As imagens obtidas da superfície dos materiais foram produzidas em um microscópio QUANTA 450 FEG (FEI, Amsterdam, Holanda) com EDS. Para tanto, as amostras foram fixadas em fita de carbono e metalizadas com prata metálica pelo equipamento de metalização Quorum QT150ES. Foi aplicado um feixe de elétrons incidente com 20 kV.

#### **4.4.10 Análise de haloidrinas acetatos 2a-b e haloidrinas 3a-b**

Os pontos de fusão foram determinados em um aparelho Microquímica modelo APF 301 e não estão corrigidos. Os RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos usando o Espectrômetro Bruker modelo Avance DRX-300, operando na frequência de 300 MHz para o hidrogênio e na frequência de 75 MHz para o carbono. Os deslocamentos químicos são dados em valores delta ( $\delta$ ) e os valores absolutos das constantes de acoplamento ( $J$ ) em Hertz (Hz). A medição da rotação óptica foi feita em um polarímetro Jasco P-2000. As conversões e os excessos enantioméricos foram medidos pelo cromatógrafo Shimadzu modelo GC 2010 equipado com um detector de ionização de chama usando coluna quiral CP-ChiralSil-DEX CB (25 mx 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ , 0,5 bar  $\text{N}_2$ ) e nitrogênio como gás de arraste (5,5 mL /min).

Para o acetato de bromohidrina **2a** e a bromohidrina **3a**: a temperatura do injetor foi mantida a 200 °C e o detector a 250 °C. A temperatura da coluna foi mantida a 125 °C por 5 min, aumentada para 145 °C a uma taxa de 0,8 °C /min e, em seguida, mantida constante por 5 min, depois aumentada para 160 °C a uma taxa de 0,5 °C/ min e mantida constante por 5 min e aumentada para 200 °C a uma taxa de 5,0 °C/ min por 10 min. Os tempos de retenção foram: acetato **2a** = (R) -**2a** 27,72 min, (S) -**2a** 28,20 min; bromohidrina **3a** = (S) -**3a** 41,70, (R) -**3a** 43,20.

Para o acetato de clorohidrina **2b** e clorohidrina **3b**: a temperatura do injetor foi mantida a 215 °C e o detector a 220 °C. A temperatura da coluna foi mantida a 130 °C por 5 min, aumentada para 145 °C a uma taxa de 0,5 °C/ min e, em seguida, mantida constante por 8 min, depois aumentada para 160 °C a uma taxa de 3,0 °C/ min e mantida constante por 5 min e aumentada para 200 °C a uma taxa de 5,0 °C/ min por 10 min. Os tempos de retenção foram: acetato **2b** = (R) -**2b** 37,34 min, (S) -**2b** 37,85 min; clorohidrina **3b** = (S) -**3b** 52,43, (R) -**3b** 56,02.

#### 4.4.11 Caracterização completa dos compostos 2a-b e 3a-b

**Dados do composto 2a:** líquido amarelo.  $R_f$  (CHCl<sub>3</sub>) = 0,62. **RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 2,18 (s, 3H); 3,60 (dd,  $J = 11,0$  Hz e 7,7 Hz, 1H); 3,74 (dd,  $J = 11,0$  Hz e 3,6 Hz, 1H); 6,37 (dd,  $J = 7,7$  Hz e 3,6 Hz, 1H); 7,25-7,41 (m, 4H). **RMN<sup>13</sup>C-BB** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 21,0; 33,2; 71,6; 127,2; 127,6; 129,9; 130,0; 132,5; 135,6; 169,9.  $[\alpha]_D^{23} = -37,4^\circ$  ( $c$  1,0, EtOAc), 97% *e.e.* Configuração absoluta de [(*R*)-2a] determinada por derivatização para o epóxido correspondente (*R*)-2-(2-clorofenil) oxirano, que apresentou  $[\alpha]_D^{20} = -55,4^\circ$  ( $c$  1,0, CHCl<sub>3</sub>), para 97% *e.e.* Lit  $[\alpha]_D^{20} = -56,9$  ( $c$  1,00, CHCl<sub>3</sub>) para 95% *e.e.* (PANDEY; UPADHYAY; KUMAR, 2006).

**Dados do composto 3a:** Líquido incolor.  $R_f$ (CHCl<sub>3</sub>): 0,42. **NMR<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 3,45 (dd,  $J = 10,4$  e 8,8 Hz, 1H); 3,8 (dd,  $J = 10,4$  e 2,7 Hz, 1H); 5,32 (dd,  $J = 8,8$  e 2,4 Hz, 1H); 7,24-7,38 (m, 3H); 7,64 (dd,  $J = 7,6$  e 1,5 Hz, 1H). **NMR<sup>13</sup>C-BB** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 38,8; 70,6; 127,4; 127,5; 129,6; 129,7; 132,1; 137,8.  $[\alpha]_D^{20} = +30,1^\circ$  ( $c$  1,0, CHCl<sub>3</sub>), para > 99% *e.e.* Configuração absoluta de (*S*)-3a determinada por derivatização de (*R*)-2-bromo-1-(2-clorofenil) acetato de etila [(*R*)-2a] para o epóxido correspondente (*R*)-2-(2-clorofenil) oxirano, que apresentou  $[\alpha]_D^{20} = -55,4^\circ$  ( $c$  1,0, CHCl<sub>3</sub>), para 97% *e.e.* Lit  $[\alpha]_D^{20} = -56,9$  ( $c$  1,00, CHCl<sub>3</sub>) para 95% *e.e.* (PANDEY; UPADHYAY; KUMAR, 2006).

**Dados do composto 2b:** líquido amarelo.  $R_f$  (CHCl<sub>3</sub>) = 0,61. **RMN<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 2,17 (s, 3H); 3,72 (dd,  $J = 12,0$  e 9 Hz, 1H); 3,84 (dd,  $J = 12$  e 6 Hz, 1H); 6,31 (dd,  $J = 6,0$  e 3 Hz, 1H); 7,27 (dd,  $J = 9,0$  e 3,0 Hz, 1H); 7,37-7,41 (m, 2H). **RMN<sup>13</sup>C-BB** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 21,0; 45,2; 71,4; 127,7; 128,9; 129,8; 133,2; 133,7; 135,3; 169,6.  $[\alpha]_D^{23} = -52,3$  ( $c$  1,0, EtOAc), para > 99% *e.e.* Lit  $[\alpha]_D^{20}$  não relatado.

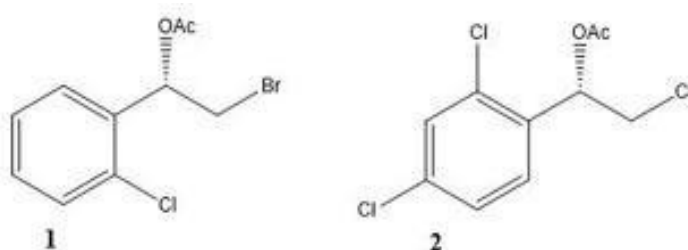
**Dados do composto 3b:** Sólido Amarelo.  $R_f$ (CHCl<sub>3</sub>): 0,45. **mp** = 47- 49 °C. **NMR<sup>1</sup>H** (CDCl<sub>3</sub>, 300 MHz):  $\delta$  (ppm) 2,5 (sb, 1H); 3,52 (dd,  $J = 7,0$  e 5,0 Hz, 1H); 3,87 (dd,  $J = 6,6$  e 2,0 Hz, 1H); 5,24 (t,  $J = 3,5$  Hz, 1H); 7,29 (t,  $J = 4,0$ , 2,5 e 1,0 Hz, 1H); 7,38 (d,  $J = 1,0$  Hz, 1H); 7,57 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H). **NMR<sup>13</sup>C-BB** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  (ppm) 49,4; 70,5; 127,8; 128,7; 129,5; 132,7; 134,8; 136,1.  $[\alpha]_D^{20} = +51,1$  ( $c$  2,5, CHCl<sub>3</sub>) para > 99% *e.e.* Lit  $[\alpha]_D^{20} = -52,8$  ( $c$  2,55, CHCl<sub>3</sub>) para 99% *e.e.* do (*R*)-enantiômero (JANECZKO; DYMARSKA; KOSTRZEWA-SUSŁOW, 2014).

#### 4.4.12 Docking Molecular - Preparação de ligantes e proteínas

As moléculas dos acetatos de  $\beta$ -clorohidrina e  $\beta$ -bromohidrina utilizando CALA e CALB imobilizados foram criadas pelo software Chem3D Figura 5, nas configurações de auto-otimização. Um campo de força MMFF94S (WAHL et al., 2019) foi aplicado, a fim de gerar conformações bioativas por minimização de conformadores gerados aleatoriamente, com o algoritmo Steepest Descente (PETROVA; SOLOV'EV, 1997), Stepper Update 4 (SUTTON; MAHMOOD; WHITE, 2016), pelo software Avogadro (HANWELL et al., 2012). Todos os arquivos com ligantes foram convertidos para os formatos correspondentes (.pdbqt) com a adição de ionização e estados tautoméricos em pH 7,4 usando o OpenBabel ver. 3.0.0 software (O'BOYLE et al., 2011).

O receptor em estudo foi a estrutura das lipases CALA e CALB, obtidas no repositório Protein Data Bank código ID CALA (3GUU) e CALB (1TCA) (BERMAN et al., 2000), cuja estrutura cristalina foi obtida pelo complexo difração de raios-X. Os resíduos interferentes, moléculas de água e inibidores sintéticos foram removidos para tornar possível o *docking* molecular. Hidrogênios polares foram adicionados aos ligantes, separadamente, e à proteína. Esta técnica visa pesquisar em bancos de dados de ligantes virtuais potenciais para um determinado alvo de proteína. O software utilizado foi o Autodock tools (MORRIS et al., 2009).

**Figura 5** - Estruturas 2D de acetatos de  $\beta$ -halohidrina.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

#### 4.4.13 Docking molecular

O *docking* molecular foi realizado por AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010) empregando multithreading de 3 vias, executando o Lamarckian Genetic. Para o encaixe da lipase CALA (3GUU), os principais parâmetros de protease foram usados: número de pontos de grade em xyz (30 30 30), espaçamento (0,642), centro de grade em xyz (9,159433 53,119167 2,118367) e para o encaixe da lipase CALB (1TCA) os seguintes parâmetros da protease principal foram usados: número de pontos da grade em

---

xyz (30 30 30), espaçamento (0,642), centro da grade em xyz (-2,847793 22,862241 14,848931). Outros parâmetros foram definidos como padrão. Ligantes de entrada como hidrogênios polares foram usados no formato .pdbqt. Por volta de dez e quarenta execuções de *docking* molecular foram realizadas, e algumas simulações foram repetidas na mesma região do receptor biológico. Assim, para validar o desempenho da simulação e quantificar a qualidade dos encaixes, foi adotado o critério de pontuação RMSD (root mean square deviation). Recomenda-se que um encaixe bem-sucedido exibe um valor  $\text{RMSD rmsd} \leq 2,0 \text{ \AA}$  (SUTHERLAND et al., 2007) e, em paralelo, o uso da rede neural NNScore com a medição na concentração molar da melhor pose (DURRANT; MCCAMMON, 2010, 2011), e o critério de energia de ligação mais baixa sugere que, no complexo previsto por *docking* molecular, a energia de ligação mais baixa é considerada mais próxima do estado do sítio ativo da enzima, onde pode ser associada a uma constante de afinidade (FU; ZHAO; CHEN, 2018; HAVRANEK; ISLAM, 2020).

Os dados de simulação com as principais interações receptor-ligante foram visualizados pelos softwares Discovery Studio (BIOVIA, 2015) e ChimeraX (PETTERSEN et al., 2021).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### ETAPA 1 - Lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em nanopartículas magnéticas: desempenho em produção otimizada de éster etílico de ácido graxo pelo método de Taguchi

#### 5.1 Parâmetros de imobilização

Os parâmetros de imobilização foram avaliados após 1 hora de imobilização utilizando uma carga enzimática de 10 mg de proteína por g de suporte para a hidrólise do *p*-NPB (50 mM). Para todos os biocatalisadores produzidos, foi preparada uma solução enzimática de referência (uma solução enzimática preparada em condições semelhantes à imobilização, mas na ausência de suporte), a atividade completa foi mantida durante todos os testes de imobilização, permitindo que o rendimento da imobilização fosse calculado pela redução da atividade no sobrenadante. Para a imobilização por adsorção (RML-NPM), o rendimento de imobilização foi de 94,7%, a atividade teórica foi de 458,0 U/g e a atividade derivada real foi de 341,3 U/g, isso permitiu uma atividade de 74,5%, como pode ser visto na Tabela 5, que contém os valores dos parâmetros de imobilização para os demais biocatalisadores.

O processo de imobilização por adsorção (RML-NPM) é favorecido pelas propriedades do APTES. O APTES tem uma alta densidade de grupo amino (BINI et al., 2012). Nesse sentido, a formação de grupos amino é favorecida pelo APTES devido ao menor número de grupos condensados. Assim, o grupo amino livre pode reagir com a superfície e ligações de hidrogênio intermoleculares podem ser formadas (BRUCE; SEN, 2005). O potencial zeta ( $\zeta$ ) das amostras funcionalizadas com amino pode variar consideravelmente com o pH. Em valores de pH mais baixos, o potencial  $\zeta$  cresce com o aumento da densidade do grupo amino, o que se correlaciona bem com a concentração superficial das nanopartículas ligadas (BINI et al., 2012). Este aumento na carga superficial positiva fornecida pelos grupos amino da superfície também resulta em uma mudança do ponto isoelétrico para valores de pH mais elevados (XU; LIU; FINCH, 1997). O APTES tem um ponto isoelétrico em pH 10,5 (XU; LIU; FINCH, 1997). A interação entre APTES e lipase durante o processo de imobilização ocorre na interface sólido-água e é postulada como envolvendo uma combinação de atração eletrostática e interação hidrofóbica (GHIACI et al., 2009; TZIALLA et al., 2010; WANG et al., 2019).

Os resultados indicaram que a RML pode ser imobilizada de forma eficiente em superfícies com APTES em uma ampla faixa de pH, com o valor ótimo sendo na



condição fisiológica de pH 7,0. Os resultados sugerem que as superfícies APTES têm locais de contato suficientes para ligar as moléculas da RML. Considera-se que uma carga maior de enzima torna a lipase um obstáculo estérico intermolecular, o que restringe a difusão do substrato e do produto. Como resultado, a atividade relativa pode diminuir lentamente em concentrações superiores a 10 mg de proteína por g de suporte. Além disso, os locais de ligação na superfície do APTES são limitados e as moléculas de enzima precisam de espaço suficiente para catalisar a reação do substrato (GOMES; PEREIRA; DE CASTRO, 2004; WANG et al., 2019).

O desempenho da imobilização também foi avaliado para os suportes ativadas com glutaraldeído. No entanto, especialmente para a atividade derivada, o suporte não ativado teve melhor desempenho do que o ativado com glutaraldeído. Portanto, RML-NPM foi usado para posterior caracterização e aplicação nesta comunicação.

**Tabela 5** - Parâmetros de imobilização da RML: (10 mg de proteína por 0,1 g de suporte foi o carregamento dos suportes, e os experimentos foram realizados em fosfato de sódio 25 mM, pH 7 na temperatura de 25 °C).

<b>Biocatalisador</b>	<b>RI (%)</b>	<b>At<sub>T</sub> (U/g)</b>	<b>At<sub>D</sub> (U/g)</b>	<b>At<sub>R</sub> (%)</b>
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-GLU-RML</b>	91.9 ± 0.2	498.5 ± 0.2	199.6 ± 3.5	40.0 ± 3.5
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES-RML</b>	94.7 ± 1.0	458.0 ± 1.0	341.3 ± 1.2	74.5 ± 1.2

**Fonte:** Elaborado pela autora.

RI: Rendimento de Imobilização;

At<sub>T</sub>: Atividade teórica do biocatalisador;

At<sub>D</sub>: Atividade derivada real;

At<sub>R</sub>: Atividade de recuperação.

A ativação do suporte com glutaraldeído gera uma alta concentração de grupos aldeído na superfície do suporte (ADRIANO et al., 2008; BONAZZA et al., 2018; MENDES et al., 2011a; RODRIGUES et al., 2008). Os grupos aldeído no suporte e os grupos amina na enzima dos resíduos de lisina são uma boa opção para fazer a ligação multiponto e, portanto, obter derivados enzimáticos altamente termoestáveis. O glutaraldeído apresenta baixa estabilidade em pH alcalino, a imobilização foi realizada em pH 7. Além disso, foi demonstrado que a atividade da lipase imobilizada em meio aquoso e anidro pode ser melhorada na presença de detergentes, provavelmente devido à quebra de agregados de lipase e/ou à mudança no equilíbrio fechado-aberto das moléculas de lipase individuais (MENDES et al., 2011a). Desta forma, a aplicação do procedimento de imobilização em condições de dissociação (por exemplo, na presença de detergentes)

pode permitir a obtenção de moléculas de lipase imobilizadas totalmente dispersas, orientadas para o sistema de imobilização (PALOMO et al., 2005). O uso de detergentes na imobilização de enzimas está relacionado ao efeito que provoca no processo, rompendo as ligações entre dímeros de enzimas, proporcionando uma melhora nas velocidades de reação (DOS SANTOS et al., 2015d; MERYAM SARDAR, 2015). Porém, segundo Fernandez-Lorente et al., (2007), a porção hidrofóbica do detergente pode interagir com o centro ativo da lipase. Como consequência, o detergente pode se comportar como um inibidor competitivo e, portanto, diminuindo os valores das atividades do derivado (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007). Na presença de surfactante, os rendimentos de imobilização foram menores, embora sem muita significância estatística.

As frações  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-GLU-RML}$  foram mal adsorvidas, embora a imobilização tenha sido predominantemente por ligação covalente, elas podem ter sido desorvidas do suporte na presença do surfactante, reduzindo assim o rendimento da imobilização (BARBOSA et al., 2012; PALOMO et al., 2008). Após a imobilização, os biocatalisadores preparados foram incubados em solução de borohidreto de sódio para redução das bases de Schiff (ligação dupla  $\text{C}=\text{N}$ ), formadas entre o grupo aldeído da amina e os grupos suporte e enzima (RODRIGUES et al., 2008). A redução dessas bases de Schiff as transformam em ligações covalentes estáveis, além de transformar os grupos aldeídos reativos em grupos hidroxila inertes, o que é uma etapa importante no processo de imobilização (RODRIGUES et al., 2008). Além disso, o suporte também pode imobilizar enzimas, mesmo que sejam ativadas muito fracamente, porque a enzima está covalentemente ligada ao suporte em apenas um ponto, uma vez que as ligações glutaraldeído-proteína são estáveis (BARBOSA et al., 2014).

Pode-se observar neste estudo que a imobilização sem a presença do Triton X-100 permitiu a formação do derivado com alta atividade catalítica e atividade recuperada, apresentando valores de  $94,7\% \pm 1,0$  e  $458,0 \pm 1,2$   $\text{Up-NPB/g}$ , respectivamente. Ou seja, a presença do detergente atuou negativamente na imobilização enzimática, visto que pode auxiliar na desorção da enzima do suporte, além disso, pode atuar como um inibidor (age como se fosse a enzima-substrato).

A imobilização da lipase de *Rhizozucor miehei* em diferentes suportes foi relatada em diversos estudos na literatura. Mohammadi et al., (2014), afirmaram em seu trabalho com imobilização de RML pelo método de adsorção em nanopartículas de sílica

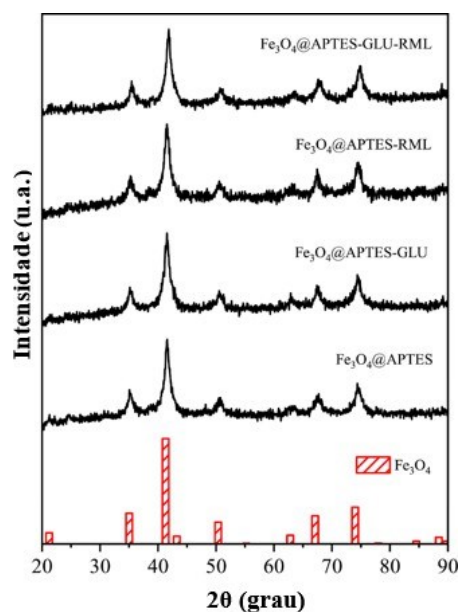
(MCM-41), suporte poroso, e funcionalizado com glicidiloxipropiltrimetoxisilano, que após 24 horas de incubação em solução tampão de fosfato de sódio 25 mM em pH 7,0 e 25 °C, eles alcançaram um rendimento de imobilização de 52%. A imobilização ocorreu principalmente no exterior das partículas, provavelmente o pequeno tamanho do poro (3,9 nm) do suporte não seja o mais adequado para que a superfície interna fique mais acessível para a imobilização da lipase.

Outros autores analisaram a imobilização da RML em aldeído-agarose funcionalizada (Gx-RML), também por adsorção, e obtiveram um rendimento de imobilização de 47%, após 20 h de incubação em pH 10 a 4 °C. Este baixo rendimento de imobilização está ligado a severas condições de imobilização (tempo e pH). Como resultado, a quantidade de grupos Lys na superfície da enzima foi reduzida, o que limitou a ligação multiponto da enzima e do suporte (YOUSEFI et al., 2020). Assim, as nanopartículas magnéticas utilizadas nesta comunicação, têm um lugar especial como matrizes de suporte e portadores versáteis para protocolos de imobilização, devido à sua grande área de superfície, alta transferência de massa e grandes proporções superfície/volume. Um dos principais gargalos para os setores de biotecnologia é a falta de purificação e recuperação eficientes de enzimas do meio de reação. Biocatalisadores imobilizados em NPsM podem ser facilmente recuperados pela aplicação de um campo magnético externo, estendendo a vida do biocatalisador por vários ciclos de recuperação (BILAL et al., 2018; ZHONG et al., 2020).

## 5.2 Caracterização dos biocatalisadores

Levando em consideração os resultados de imobilização obtidos com o suporte Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES, foram realizadas caracterizações adicionais das amostras para investigação de suas propriedades estruturais, magnéticas e químicas. A estrutura e a composição da fase do suporte foram confirmadas por XRPD, conforme mostrado na Figura 6. As amostras apresentaram picos amplos a  $2\theta$  de 21,3, 35,2, 41,5, 50,7, 63,0, 67,5, 74,3 84,6 e 89,1°, que podem ser atribuídos (111), (220), (311), (400), (422), (511), (440), (620) e (533) planos, respectivamente, de uma estrutura espinélica, relacionada a Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (JCPDS 01- 086-1358). Além disso, os padrões de DRX antes e depois das imobilizações físicas e químicas são semelhantes, indicando que a presença de glutaraldeído e lipase nos nanocompósitos não afeta a estrutura do suporte.

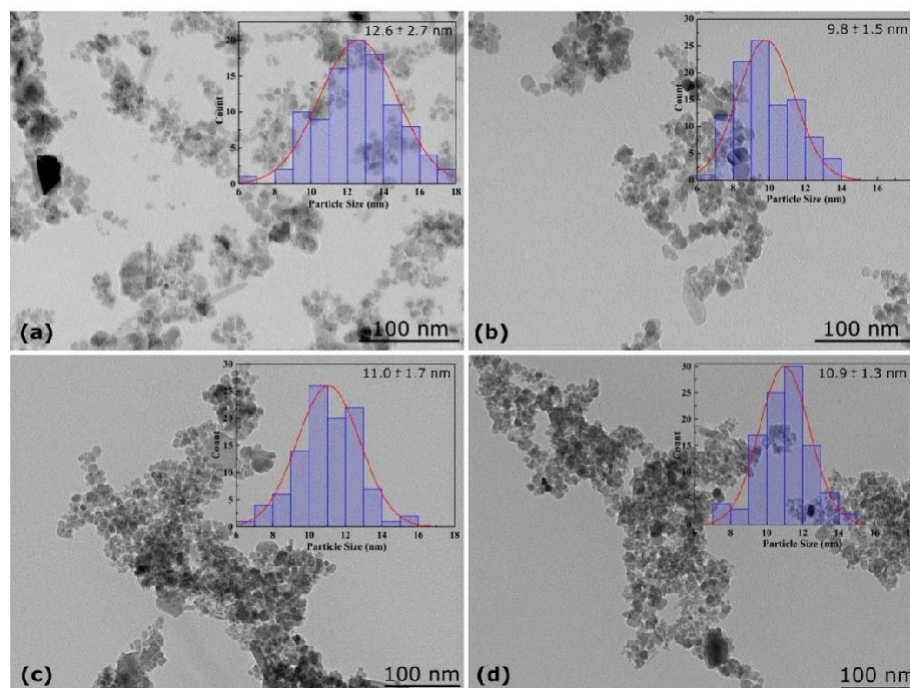
**Figura 6** - Padrões de XRPD de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES}$  antes e depois da imobilização química e física da RML e padrão de referência de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , JCPDS 01-086-1358.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Para investigar o tamanho, bem como a morfologia do biocatalisador, foi realizado o MET. As micrografias para cada amostra são exibidas na Figura 7. A inserção em cada micrografia apresenta o gráfico de distribuição do tamanho relacionado à amostra. Para construir este gráfico, 100 NPsM de diferentes regiões da grade TGA foram escolhidos e medidos aleatoriamente. Para obter o tamanho desses nanomateriais truncados, o diâmetro estatístico do feret's foi usado para medir cada NPsM. Além disso, uma função log-normal para ajustar os dados e o diâmetro médio foram encontrados para ser  $12,6 \pm 2,7$ ,  $9,8 \pm 1,5$ ,  $11,0 \pm 1,7$  e  $10,9 \pm 1,3$  nm para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES}$ , (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-GLU}$ , (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-GLU-RML}$  e (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-RML}$ , respectivamente. Levando esses valores em consideração, os diâmetros médios dos nanomateriais podem ser considerados estatisticamente iguais. Além disso, nenhuma morfologia irregular foi observada.

**Figura 7** - Imagens MET das amostras estudadas: (a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES}$ , (b)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-GLU}$ , (c)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-GLU-RML}$  e (d)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{APTES-RML}$ . A inserção em cada micrografia exibe o gráfico de tamanho de distribuição construído com base na medição de 100 NPsM escolhidos aleatoriamente.

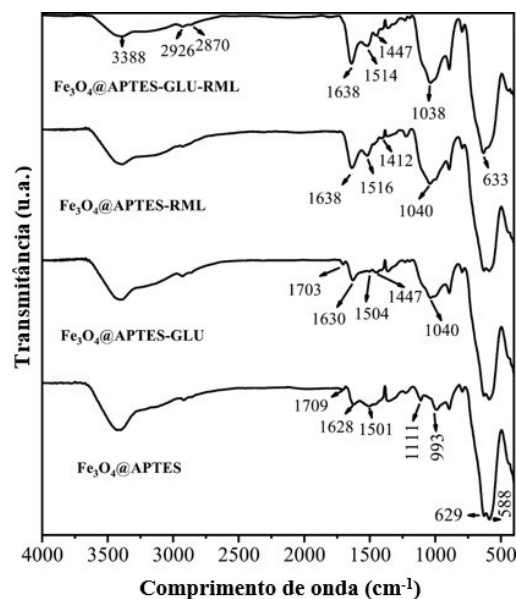


Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 8 mostra os espectros de FTIR do suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES antes e depois da ligação química, bem como a adsorção física de RML. Todas essas amostras mostraram bandas em torno de  $3388$  e  $1638\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas a vibrações de alongamento sobrepostas de hidroxilas e grupos N-H e vibrações de flexão sobrepostas de  $\text{H}_2\text{O}$  adsorvido e grupos amino livres na superfície das nanopartículas, respectivamente (KARIMI; MILANI; ABOLGASHEMI, 2016; SHAFIEE; AHANGAR; SAFFAR, 2019). As bandas observadas em torno de  $629$  e  $588\text{ cm}^{-1}$  são características de vibrações de Fe-O nas fases  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , indicando que os materiais sintetizados consistem em  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  parcialmente oxidado, conforme evidenciado no XRPD (ANDRADE NETO et al., 2017). A funcionalização do suporte foi evidenciada pela presença de bandas em  $2926$ ,  $2870$ ,  $1111$  e  $993\text{ cm}^{-1}$ , o que pode ser atribuído ao alongamento C-H assimétrico e simétrico das vibrações de alongamento  $-\text{CH}_2$  e Si-O-H e Si-O, respectivamente (SHAFIEE; AHANGAR; SAFFAR, 2019). Após a reação com glutaraldeído, as bandas em  $1709$  (alongamento C=O do grupo aldeído) e  $1503$  (curvatura N-H)  $\text{cm}^{-1}$  mudaram de forma, como esperado com a modificação dos grupos amino de APTES para deixar grupos aldeído livres (KARIMI; MILANI; ABOLGASHEMI, 2016). A eficácia da imobilização de RML foi evidenciada pelo aumento da intensidade relativa das bandas em  $1657$ ,  $1535$  e  $1458\text{ cm}^{-1}$ , atribuídas ao alongamento C=O (amida I), flexão N-H (amida II) e simétrica flexão de C-H saturado, respectivamente (ABDUL MANAN et al., 2018; ZHANG et al., 2020). A imobilização química na amostra  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES-

GLU-RML foi confirmada pelo desaparecimento da banda do aldeído ( $1709\text{ cm}^{-1}$ ) no espectro. Além disso, mudanças de picos característicos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES\text{-GLU}$  sugerem a existência de interações eletrostáticas e ligações de hidrogênio entre esses suportes e RML.

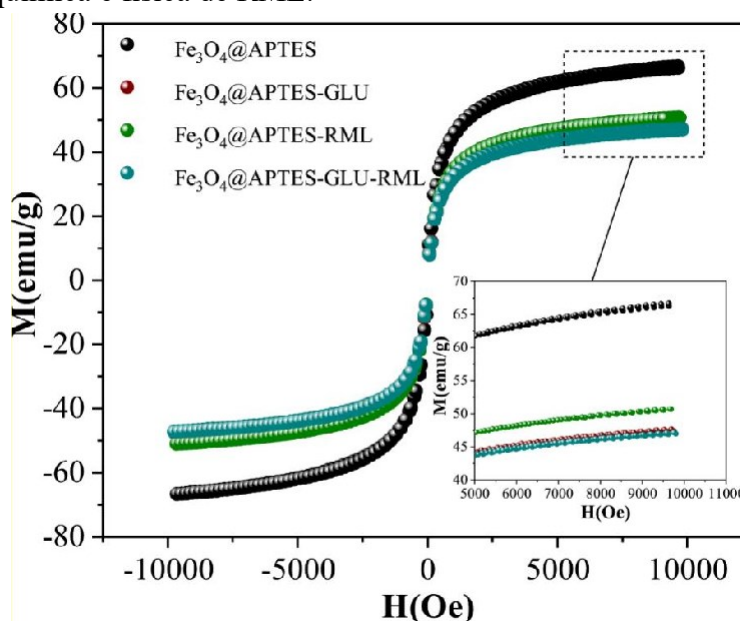
**Figura 8** - Espectros de FTIR de NPsM de  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$  antes e depois da imobilização química e física de RML.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

A Figura 9 mostra as curvas de magnetização em temperatura ambiente para os materiais obtidos com o suporte  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$ . Nenhuma histerese foi observada para as amostras, o que evidencia a natureza superparamagnética. Os valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ) foram encontrados em 66,70, 50,76, 47,69 e 47,00 emu/g para  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES\text{-RML}$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES\text{-GLU}$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4@APTES\text{-GLU-RML}$ , respectivamente. Esses valores são menores do que o relatado para  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  bruto (92 emu/g). No entanto, isso pode ser explicado com base na presença de distúrbios de spin de superfície (camada morta) conforme o tamanho da partícula diminui (SHARIFI DEHSARI et al., 2018; WANG et al., 2016). Além disso, outra contribuição significativa vem da existência de materiais não magnéticos fixados na superfície do suporte magnético. Nesse sentido, é importante notar que os menores valores de  $M_s$  para materiais obtidos após modificação química e imobilização corroboram que a funcionalização e imobilizações foram bem-sucedidas.

**Figura 9** - Curvas de magnetização a 300 K de NPsM  $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ APTES antes e depois da imobilização química e física de RML.

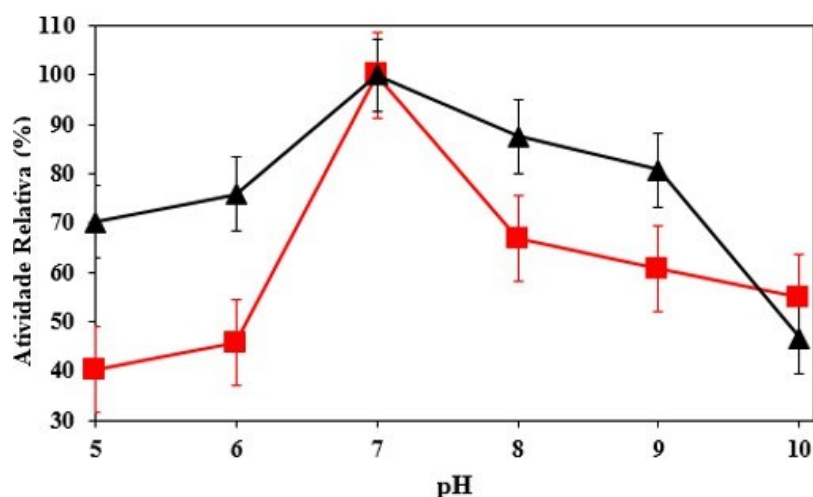


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.3 Efeito do pH

Todos os biocatalisadores, lipase livre e imobilizada, foram ressuspensos em diferentes valores de pH do tampão 25 mM na faixa de pH de 5 a 10 (acetato de sódio (faixa de pH 3,6 - 5,6), fosfato de sódio (faixa de pH 5,8 - 8,0) e carbonato de sódio (faixa de pH 8,9 - 10,8)). Um parâmetro muito importante na preparação de biocatalisadores ativos é o pH de imobilização, pois influencia o grau de ionização das moléculas de proteína e a carga superficial dos suportes (HUANG; LIAO; CHEN, 2006). O efeito do pH no desempenho dos biocatalisadores solúveis e imobilizados foram avaliados pela análise da atividade na faixa de pH 5 a pH 10, uma faixa limite para a estabilidade do substrato. Na Figura 10, é possível observar que a RML solúvel e imobilizada apresentou atividade máxima em pH 7. Outros autores analisaram o efeito do pH na atividade da RML e obtiveram o mesmo perfil apresentado neste estudo, em que a maior atividade foi em pH 7 (ADAMCZAK; BEDNARSKI, 2004; DE OLIVEIRA et al., 2018).

**Figura 10** - Efeito do valor de pH na atividade de *p*-NPB da RML (triângulos pretos) e RML-MNP (quadrados vermelhos). Mais detalhes são fornecidos na Seção 2. 100% é considerado a atividade da enzima livre em pH 7 (condições ótimas para a enzima) e corresponde a cerca de 450 U/mg.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ambos, RML solúvel e imobilizado, apresentaram comportamento semelhante para valores de pH ácido e básico. De fato, foi possível observar menor atividade em valores de pH mais ácidos (pHs 5 e 6) e maior atividade em valores de pH mais alcalinos (pHs 8 e 9). No entanto, a atividade da RML solúvel e imobilizada diminuiu à medida que o valor do pH se aproxima do pH 10. Essa redução pode estar ligada ao fato de esta ser uma faixa de pH não adequada para RML, comprometendo a estabilidade do biocatalisador (DE OLIVEIRA et al., 2018; RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b).

Com base na literatura, o pH de imobilização altera o equilíbrio entre as cargas positivas e negativas na superfície da enzima (DE ALBUQUERQUE et al., 2016; MACHADO et al., 2019), gerando possível repulsão eletrostática entre as moléculas de lipase e o suporte de troca iônica em valores de pH alcalinos. Os resultados mostram que o pH da imobilização pode alterar a orientação da enzima no suporte preparado, ou seja, suas características, por exemplo, a atividade catalítica (BARBOSA et al., 2014; MACHADO et al., 2019). A imobilização em pH 7 é importante devido a uma maior reatividade dos grupos amino-terminais do que as reatividades de todos os grupos amino Lys em valores de pH neutros (MATEO et al., 2005). Porém, em pH 6-7, ligações covalentes de suporte enzimático podem ocorrer entre os diferentes grupos disponíveis em alta concentração no suporte e alguns nucleófilos de proteínas que estão na área exposta ao suporte (BOLIVAR et al., 2009). Além disso, o pH pode aumentar a desnaturação enzimática implicando na redução da atividade catalítica (GARCIA-GALAN et al., 2011). Por outro lado, a atividade catalítica da enzima depende da



estrutura conformacional da proteína, mesmo pequenas alterações na estrutura terciária da proteína resultaram na perda de sua atividade catalítica (ANSARI; HUSAIN, 2011).

Um fator que influencia o processo de imobilização é o ponto isoelétrico da enzima. Nesse ponto, pode ocorrer a máxima interação hidrofóbica entre a lipase e a superfície de suporte, que é chamada de mecanismo de ativação interfacial, que beneficia o processo de adsorção enzimática e o posicionamento das moléculas do substrato fora do biocatalisador (TEODORO et al., 2019). O ponto isoelétrico da lipase de *Rhizomucor miehei* é de aproximadamente 3,8 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010b). Esse efeito do ponto isoelétrico pode ser visto na Figura 10. A partir do pH 5, é possível observar a interação entre a lipase e o suporte, para a lipase imobilizada em relação à lipase em sua forma solúvel, comprovando o mecanismo de ativação interfacial do processo de imobilização (TEODORO et al., 2019).

#### 5.4 Estabilidade térmica

A RML solúvel e imobilizada foi analisada quanto à inativação térmica e por pH, sob uma temperatura de 60 °C. A estabilidade de RML-MNP foi maior em pH 7 ( $t_{1/2}$  = 108 min), seguida por pH 5 ( $t_{1/2}$  = 105 min) e a menor foi em pH 10 ( $t_{1/2}$  = 91 min), enquanto RML mostrou maior estabilidade em pH 7 ( $t_{1/2}$  = 12,8 min), seguido por pH 5 ( $t_{1/2}$  = 6,5 min) e pH 10 ( $t_{1/2}$  = 5,8 min) (ver Tabela 6). A rápida desativação térmica da RML solúvel foi relatada na literatura (DE OLIVEIRA et al., 2018; RAHMAN et al., 2018). Portanto, a imobilização da RML em Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES foi capaz de aumentar sua termoestabilidade. Isso pode estar relacionado às propriedades superficiais do suporte e ao método de imobilização (CUI et al., 2013). Além disso, o microambiente entre a enzima e o suporte pode ser outro motivo importante (CUI et al., 2013). Quando a enzima é imobilizada, a afinidade do suporte pela água pode influenciar sua atividade catalítica.

**Tabela 6** - Meia-vida para RML e Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@APTES a 60 °C e pHs 5, 7 e 10.

Biocatalisador	Meia - Vida ( $t_{1/2}$ ,min)		
	pH 5	pH7	pH10
RML	6.4	12.8	5.8
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @APTES-RML	105	108	91

Fonte: Elaborado pela autora.

Neste trabalho, outra possível razão para o aumento da estabilidade térmica da lipase imobilizada no suporte sólido modificado com amino pode estar relacionado a uma mudança no microambiente ao redor da enzima devido à presença de grupos amino (BOLIVAR; NIDETZKY, 2019). Como um polímero catiônico, o APTES tem sido usado para adsorver enzimas e estabilizar proteínas em solução, evitando a oxidação e agregação (AISSAOUI et al., 2013; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). Como resultado, um polímero catiônico e provedor de grupo amino poderia imobilizar a lipase por troca iônica. Em seguida, a lipase poderia ser imobilizada em suporte por ligação covalente e troca iônica por imobilização multiponto, que era mais estável do que a imobilização por ligação covalente sozinha (GODOY et al., 2011). Além disso, a estrutura secundária da lipase estava mais integrada ao polímero catiônico. Portanto, a modificação da superfície com um polímero catiônico seria benéfica para melhorar a atividade e estabilidade da enzima imobilizada, bem como aumentar a quantidade de carga (COWAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; TIAN et al., 2016).

Além disso, a temperatura pode causar o desdobramento da estrutura terciária da RML, o que pode resultar na modificação de seu sítio ativo e causar a desativação da lipase (DAVE; MADAMWAR, 2006). Porém, a imobilização da RML pode aumentar a rigidez do biocatalisador, tornando-se menos suscetível às alterações conformacionais causadas pelo aumento da temperatura; além disso, a imobilização da RML pode ter estabilizado a lipase em sua conformação aberta, o que ocasiona aumento da atividade enzimática (DE OLIVEIRA et al., 2018; RAHMAN et al., 2018).

### **5.5 Otimização da produção de éster etílico de ácido graxo**

Como pode ser visto na Tabela 7, a corrida 6 apresentou a maior conversão em éster etílico e relação S/R, utilizando 5% de conteúdo de biocatalisador e razão molar de 1: 1 (AGLs /álcool), em 6 horas de reação a 40 °C. Usando a função “maior é melhor”, foi possível determinar os níveis das variáveis de reação para a produção otimizada de éster etílico de ácido graxo. Como pode ser visto na Tabela 8, os níveis de reação ideais foram L1 (30 °C) para a temperatura de reação, L2 (4 h) para o tempo de reação, L1 (1:1) para a razão molar (AGLs /álcool) e L3 (9%) para o conteúdo de biocatalisador; nestas condições, a conversão teórica é de 83%. Estas condições ótimas foram validadas por análise cromatográfica de ésteres etílicos, seguindo a norma EN 14103 com algumas modificações, o valor obtido foi de 78,9% ± 0,3%. O resultado otimizado encontrado

através da análise cromatográfica foi menor que o valor teórico da conversão proposta pelo método. Vale ressaltar que, por se tratar de um processo biológico, o resultado é suscetível à interferência de diversos fatores. Álcool de cadeia curta e o óleo vegetal formam uma solução na qual a proporção molar é de aproximadamente 1:1 (a uma temperatura de 40 °C). Quando o álcool é insolúvel na reação, ocorre a formação da emulsão e o tamanho das partículas dependem da intensidade da agitação. Como resultado, o biocatalisador pode sofrer inativação. Ao adicionar solvente orgânico à solução, a solubilidade do álcool aumenta, protegendo as enzimas da inativação e garantindo que a conversão em ésteres possa ocorrer (SZCZĘSNA ANTCZAK et al., 2009). Os autores (SHIEH; LIAO; LEE, 2003), avaliaram a produção de biodiesel a partir do óleo de soja, utilizando o Lipozym RM, versão imobilizada comercial da lipase de *Rhizomucor miehei* na reação de transesterificação. Os autores obtiveram uma conversão de 92,2% no tempo de 6,3h, com relação molar de 3,4:1 (metanol: óleo) a uma temperatura de 37 °C (SHIEH; LIAO; LEE, 2003). Porém, o valor de 78,9% ± 0,3% de conversão em ácidos graxos de ésteres etílicos obtido na presente comunicação usando lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em nanopartículas magnéticas por adsorção, foi alcançado em 4 horas com temperatura de 30 °C, condições de reação mais brandas e com menor consumo de energia.

De acordo com a Resolução nº 51 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), a conversão em ésteres deve apresentar um valor mínimo de 96,5% para ser considerada como biodiesel. Como o valor máximo obtido no presente estudo foi de 78,9% ± 0,3%, não foi possível produzir biodiesel no presente estudo.

**Tabela 7** - Método de Taguchi para a reação de esterificação dos ácidos graxos do óleo babaçu.

Experimento	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Razão Molar AGLs:Alcohol	Biocatalisador (%m/m)	Conversão (%)	S/R
1	30	2	1:1	1	14.6 ± 0.5	23.3
2	30	4	1:3	5	45.1 ± 0.1	33.1
3	30	6	1:5	9	45.3 ± 0.0	33.1
4	40	2	1:3	9	50.5 ± 0.1	34.1
5	40	4	1:5	1	6.9 ± 0.6	16.8
6	40	6	1:1	5	81.7 ± 0.7	38.2

7	50	2	1:5	5	10.2 ± 0.6	20.2
8	50	4	1:1	9	79.8 ± 0.7	38.0
9	50	6	1:3	1	5.4 ± 0.2	14.7

Fonte: Elaborado pela autora.

Em estudos desenvolvidos por (MOHAMMADI et al., 2015), os autores imobilizaram a lipase de *Rhizomucor miehei* em dois suportes: sílica (sílica-RML) e nanopartículas de sílica (SBA-RML). Esses biocatalisadores foram aplicados na reação de transesterificação do óleo de colza com metanol para a síntese de ésteres metílicos em um sistema livre de solventes. Para a sílica-RML, o rendimento de conversão foi de 43% após 72 h de incubação a 50 °C para 200 mg de sílica-RML e uma razão molar de 3:1 (metanol: óleo). O rendimento de conversão para o SBA-RML foi de 28%, nas mesmas condições de reação relatadas anteriormente (MOHAMMADI et al., 2015). Outros autores avaliaram a síntese de ésteres etílicos do óleo de soja pela lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em ZIF-8 pelo método de encapsulação; como resultado, mostrou uma conversão de 84,7% após 17 h de incubação a 45°C para 6% em peso de biocatalisador (RML@ZIF-8) e uma razão molar de 1:4 (óleo: álcool) (ADNAN et al., 2018). Portanto, os resultados otimizados obtidos nesta comunicação para a síntese de ácidos graxos de ésteres etílicos de óleo de babaçu residual apresentaram valores superiores quando comparados a alguns biocatalisadores apresentados na literatura sob condições de reação mais brandas. Porém, em comparação com o biocatalisador que foi imobilizado pela metodologia de encapsulamento, o RML-NPM exibiu um resultado ligeiramente inferior, mas ainda sob condições de reações mais brandas. Isso estaria atrelado ao fato de que na metodologia de imobilização por adsorção é um procedimento com envolve ligações mais fracas do que o encapsulamento, pois pode ocorrer uma dessorção mais fácil da enzima do suporte (ADNAN et al., 2018; BOUDRANT; WOODLEY; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2020).

**Tabela 8** - Resposta das relações S/R.

Níveis	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Razão Molar AGLs:Álcool	Biocatalisador (%m/m)
L1	29.8	25.8	33.2	18.3
L2	29.7	29.3	27.3	30.5
L3	24.3	28.7	23.3	35.1
Delta	5.5	3.5	9.8	16.8

---

Ranking	3	4	2	1
---------	---	---	---	---

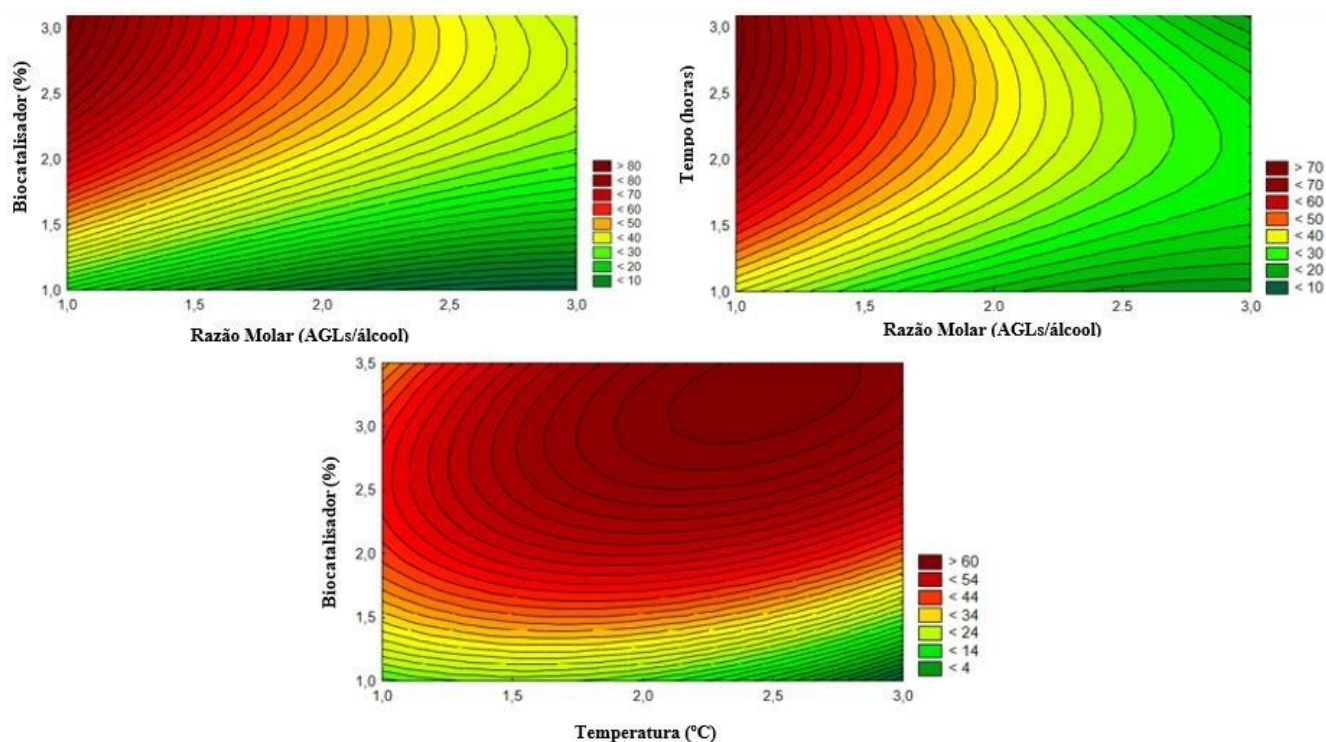
---

**Fonte:** Elaborado pela autora.

Com base na Tabela 8 e na Figura 10 (A), a variável mais significativa para a produção de éster etílico de ácido graxo a partir de ácidos graxos livres do óleo residual de babaçu foi o conteúdo do biocatalisador. Na verdade, a quantidade de biocatalisador é um parâmetro importante para determinar o rendimento do éster etílico de ácido graxo; como a concentração de biocatalisador é alta, o rendimento de ésteres etílicos de ácidos graxos aumenta, à medida que mais moléculas de substrato irão se adsorver ao sítio ativo da lipase (DURAIARASAN et al., 2016; JEGANNATHAN et al., 2010).

Na Tabela 8 e na Figura 10 (B), como pode ser visto, a razão molar em seu nível mais baixo influenciou positivamente a produção de éster etílico de ácido graxo. É importante notar que o valor de conversão é influenciado pelas propriedades do substrato e pela natureza do catalisador (MADRAS; KOLLURU; KUMAR, 2004). Os álcoois podem desempenhar duas funções nas reações de esterificação. O primeiro está relacionado ao excesso de álcoois que podem aumentar a taxa de reação e impulsionar o alto rendimento. Em segundo lugar, uma alta concentração de álcool pode afetar negativamente as enzimas, que geralmente as tornam mais instáveis no álcool, como o metanol e o etanol. Assim, a desativação do biocatalisador por meio do contato com álcool solúvel presente em uma reação resulta em reduções na produção de éster etílico ou metílico (ADNAN et al., 2018). Pode-se observar que a melhor conversão para ésteres etílicos foi encontrada na razão molar de 1:1 e que não aumentou significativamente o valor de conversão em razões molares maiores. A lipozyme RM-IM foi estudada para a produção de éster etílico de ácidos graxos utilizando óleo de peixe e etanol como substrato, os autores concluíram que os maiores rendimentos foram encontrados na menor relação molar 1: 0,25 (óleo de peixe/ etanol), mostrando a baixa resistência da enzima à presença de álcool (MARÍN-SUÁREZ et al., 2019). Por outro lado, ao contrário dos demais parâmetros, o tempo não influenciou os valores de conversão no intervalo entre 2 e 6 horas, conforme mostrado na Tabela 8. Porém, com base na Tabela 7, a maior conversão foi encontrada no maior tempo (6 h). As conversões para ésteres etílicos de ácidos graxos podem ser aumentadas em tempos de reação mais longos (MACEIRAS et al., 2009).

**Figura 10** - Superfícies de contorno para produção de biodiesel. (A) Razão Molar (AGLs/álcool) versus biocatalisador (%). (B) Razão Molar (AGLs/álcool) versus Tempo (horas). (C) Temperatura (°C) versus biocatalisador (%).



Fonte: Elaborado pela autora.

Com base na Figura 10 (C) e na Tabela 8, é possível observar que as temperaturas mais amenas tiveram um papel positivo na produção do éster etílico de ácidos graxos. Temperaturas mais altas geram um custo extra para qualquer processo industrial e podem causar a desnaturação de enzimas, causando uma redução na eficiência enzimática (FJERBAEK; CHRISTENSEN; NORDDAHL, 2009). De fato, para reações catalisadas por lipases, a taxa de reação pode ser melhorada com o aumento da temperatura até um determinado nível, uma vez que em altas temperaturas, as lipases podem sofrer desnaturação (WU et al., 2003).

Os dados de conversão de ácidos graxos livres em ésteres etílicos otimizados pelo método de Taguchi foram analisados estatisticamente por meio da Análise de Variância (ANOVA) apresentada na Tabela 9. Para identificar o parâmetro de processo mais significativo para a conversão, foi necessário determinar a contribuição percentual de cada fator. Essa contribuição percentual dos parâmetros foi calculada com base na média da conversão e na relação S/R estimada. Dentre os parâmetros estudados, apenas o conteúdo do biocatalisador e a razão molar (AGLs: álcool) teve efeito significativo na conversão ( $p$ -valor < 0,05), os demais parâmetros não apresentaram resultado

estatisticamente significativo. Desta forma, o conteúdo do biocatalisador foi o fator que mais influenciou na conversão (contribuição de 66,6%), corroborando os resultados apresentados na Tabela 8 e na Figura 10.

**Tabela 9** - ANOVA para parâmetros que afetam a esterificação do óleo de babaçu.

Fator	DF	SS	MS	F-valor	p-valor	Contribuição (%)
Temperatura	1	59,5	29,7	0,07	0,803	0,21
Tempo	1	20,5	543,40	2,50	0,189	7,48
Razão Molar	1	147,2	73,6	9,93	0,034	29,65
Biocatalisador	1	453,9	226,9	16,98	0,015	50,72
Erro	4	867,90				
Total	8	681,1				100

<sup>1</sup>Significa que um intervalo de confiança de 95% reflete um nível de significância <0,05.

Fonte: Elaborado pela autora.

## ETAPA 2 – Coimobilização das Lipases A e B de *Candida antarctica* em quitosana otimizado pelo método de Taguchi: Caracterização, aplicação de resolução cinética e estudos de docking molecular

### 5.6 Otimização da imobilização de CALA e CALB em QUI

A utilização do método Taguchi é um recurso poderoso para avaliar diversos fatores nas condições de um processo, determinando quais variáveis proporcionam maior efeito na resposta (MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020). No presente estudo, as combinações de fatores independentes em seus respectivos níveis, os valores dos fatores dependentes e a relação S/R para um planejamento experimental de matriz ortogonal, são mostrados na Tabela 10. A relação S/R foi determinada pela função “maior é melhor”, a fim de maximizar a atividade do biocatalisador (CALA-CALB-QUI).

**Tabela 10** - Matriz do projeto de matriz ortogonal L9 juntamente com os valores de atividade CALA-CALB-QUI e as razões S/R.

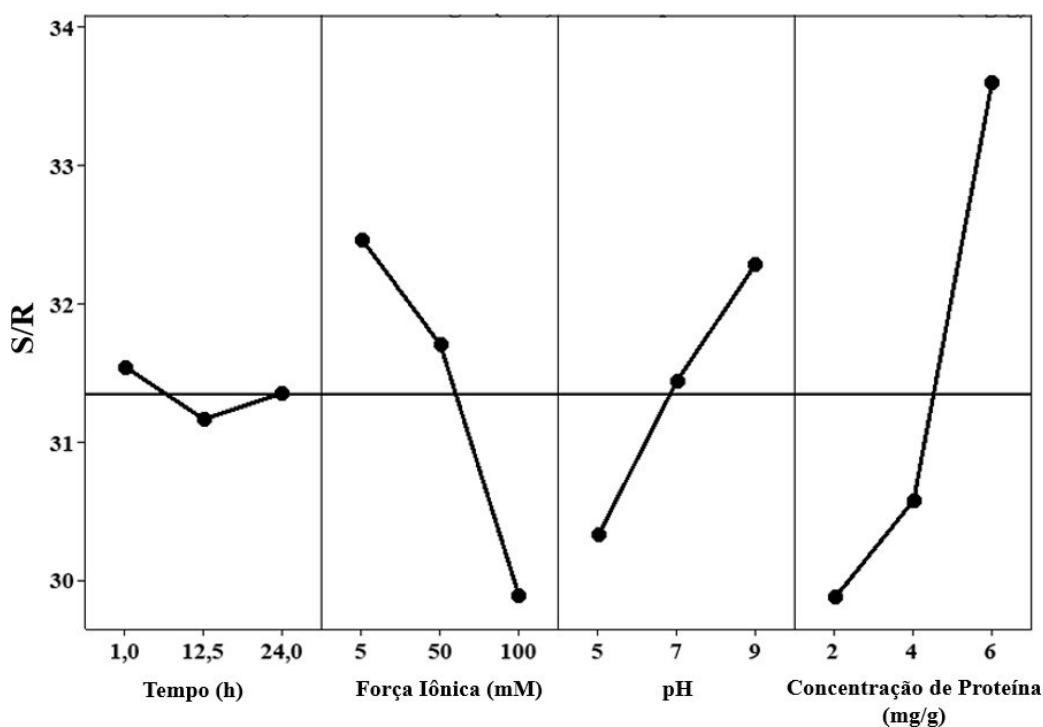
Experimento	Tempo (h)	Força Iônica (mM)	pH	Concentração de Proteína (mg/g)	Atividade do Biocatalisador (U/g)	S/R
1	1	5	5	2:1	32,18 ± 0.12	30,15
2	1	50	7	4:1	36,33 ± 0.33	31,21
3	1	100	9	6:1	46,05 ± 0.10	33,26
4	12,5	5	7	6:1	53,83 ± 0.22	34,62

5	12,5	50	9	2:1	35,35± 0.33	30,97
6	12,5	100	5	4:1	24,83± 0.33	27,90
7	24	5	9	4:1	42,77± 0.10	32,62
8	24	50	5	6:1	44,32± 0.41	32,93
9	24	100	7	2:1	26,61± 0.27	28,50

Fonte: Elaborado pela autora.

A maior atividade CALA-CALB-QUI é obtida pela maior razão S/R que corresponde aos parâmetros do experimento 4, o que sugere o melhor nível para cada parâmetro. A razão S/R ótima prevista para as condições otimizadas foi calculada a partir da Equação 5. Para o presente estudo, a maior relação S/R otimizada fornecida pelo software foi de 35,84, o que sugere que os melhores níveis para cada parâmetro sejam L1 (1 hora) para o tempo, L1 (5 mM) para força iônica, L3 (9) para pH e L3 (6:1, carga de enzima (mg)/ g de suporte) para a concentração de proteína, conforme pode ser observado na Figura 11. Para essa combinação de parâmetros, a atividade de prevista pelo o programa para CALA-CALB-QUI é de 56,48 U/g, enquanto que a atividade experimental de CALA-CALB-QUI foi de 56,02 ± 0,23 U/g.

**Figura 11** - Relação S/R para tempo, força iônica, pH e concentração de proteína para otimização de imobilização CALA e CALB em QUI.



Fonte:

Elaborado pela autora.



---

Em condições otimizadas (pH 9, 5 mM, carga de proteína 6:1 e 1 hora, o rendimento de imobilização (RI) foi de  $80,00 \pm 0,01\%$  e a atividade do derivado ( $A_{TD}$ ) foi de  $46,01 \pm 0,35$  U /g, enquanto a atividade de recuperação ( $A_{TR}$ ) foi de  $28,50 \pm 0,52\%$  e para atividade teórica ( $A_{TR}$ ) de  $164,87 \pm 1,78$  U/g. Monteiro et al., (2019) imobilizou lipase A de *Candida antarctica* em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e ativadas com glutaraldeído alcançando um rendimento de imobilização de  $84,1 \pm 1,1\%$  (MONTEIRO et al., 2019b). As nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana e ativada com GLU também foram utilizadas por Osuna et al. (2015) para imobilizar a lipase de *Aspergillus niger* e alcançou um rendimento de imobilização de  $90,1\%$  (OSUNA et al., 2015).

A lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada em grânulos de quitosana por Pinheiro et al. (2019), na imobilização sem glutaraldeído como agente ativador o rendimento de imobilização foi de  $55,6 \pm 1\%$  e na presença de glutaraldeído foi de  $91,0 \pm 1\%$  (PINHEIRO et al., 2019). Santos et al. (2017) imobilizaram CALB em quitosana ativada com glutaraldeído e atingiram um rendimento de imobilização de  $94,70 \pm 1,37\%$  (DOS SANTOS et al., 2017). Com isso, os parâmetros de imobilização que foram alcançados no presente estudo estão de acordo com os relatados na literatura, principalmente no que diz respeito ao rendimento de imobilização, mesmo se tratando de uma coimobilização simultânea de duas lipases.

O processo de modificação que a quitosana sofre reduz a sua capacidade de retenção de água melhorando o seu desempenho, o que a torna mais resistente (BERGER et al., 2004; MONTEIRO et al., 2019b). O acoplamento covalente de enzimas na matriz de quitosana é normalmente executado pela reação do glutaraldeído com grupos amino poliméricos (ADRIANO et al., 2008). A reticulação dos grupos amina da quitosana com os grupos aldeído do glutaraldeído formam grupos imina, proporcionando estabilidade e uma capacidade maior de adsorção (ADRIANO et al., 2008; PINHEIRO et al., 2019). A utilização do glutaraldeído no processo de imobilização investigado, é capaz de promover a modificação de todos os grupos amino da quitosana, que possam reagir com os resíduos amino da lipase (OSUNA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2008). Os suportes ativados com glutaraldeído imobilizam as lipases através de um triplo mecanismo: troca iônica, ativação interfacial e fixação covalente, com isso uma quantidade considerável de enzima é ligada rapidamente ao suporte, proporcionando um aumento no rendimento imobilização (BARBOSA et al., 2014). Dessa forma, as lipases podem ser imobilizadas

covalentemente em quitosana através da ligação do grupo aldeído do glutaraldeído e o grupo amino terminal das lipases (MONTEIRO et al., 2019b).

A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos pode causar a ativação da enzima e esta ativação depende da relação enzima/suporte que ocorre durante o processo do protocolo de imobilização. No caso de uma baixa relação proteína/suporte pode existir ainda a presença de alguns sítios de adsorção disponíveis e alguma ativação ainda pode ocorrer, contudo, esta situação não é a ideal, pois as forças atrativas entre os sítios de adsorção da proteína que ainda estão livres podem distorcer a conformação estrutural da lipase (ORLANDO BEYS SILVA et al., 2005; PALOMO et al., 2003). É possível observar que na maior concentração de proteína (6:1 mg/g) foi a que apresentou as melhores atividades do derivado no presente estudo, provavelmente o suporte não saturou na condição no qual foi submetido.

De fato, a concentração de proteína foi o fator que mais influenciou na imobilização de CALA e CALB em quitosana, como pode ser observado na Tabela 11. A classificação dos parâmetros (tempo, força iônica, pH e concentração de proteína), com base nos valores delta (a diferença dos valores da razão S/R entre os níveis mais altos e mais baixos dos fatores de processo) é mostrada na Tabela 11.

**Tabela 11** – Tabela de resposta de relações S/R.

Nível	Tempo (h)	Força Iônica (mM)	pH	Concentração de Proteína (mg/g)
1	31,54	32,47	30,33	29,87
2	31,16	31,70	31,44	30,58
3	31,35	29,89	32,29	33,61
<b>Delta</b>	0,38	2,58	1,96	3,73
<b>Ranking</b>	4	2	3	1

Fonte: Elaborado pela autora.

Como pode ser observado na Tabela 11, além da concentração de proteína, a força iônica foi o outro parâmetro que mais influenciou na imobilização de CALA e CALB em quitosana. Na verdade, como pode ser visto na tabela de Análise de Variância (ANOVA), Tabela 12, no intervalo de confiança de 95%, a concentração de proteína e a força iônica foram os únicos parâmetros estatisticamente significativos ( $p$ -valor <0,05) e que mais contribuíram para a imobilização (57,60% para concentração de proteína e 22,64% para força iônica) de CALA e CALB em QUI.

**Tabela 12** – Resultados da ANOVA para os parâmetros que afetam a imobilização.

<b>Fator</b>	<b>DF</b>	<b>SS</b>	<b>MS</b>	<b>F- valor</b>	<b>p- valor</b>	<b>Contribuição (%)</b>
<b>Tempo (h)</b>	1	0,123	0,123	0,01	0,930	0,02
<b>Força Iônica (mM)</b>	1	164,137	164,137	11,70	0,027	22,64
<b>pH</b>	1	86,980	86,980	6,20	0,068	12,00
<b>Concentração de Proteína (mg/g)</b>	1	417,638	417,638	29,76	0,005	57,60
<b>Erro</b>	4	56,127	14,032			7,74
<b>Total</b>	8					100,00

**Fonte:** Elaborado pela autora.

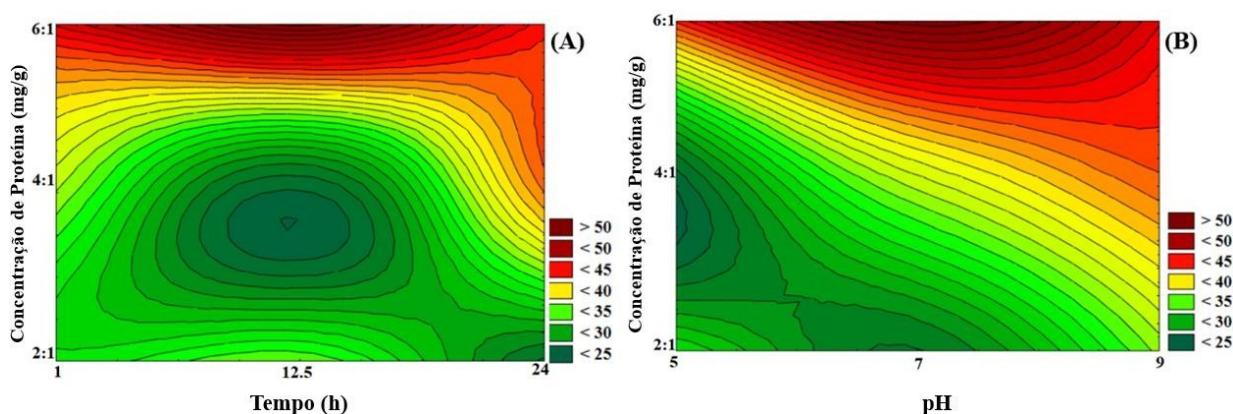
Como descrito anteriormente a quitosana possui a característica de ser um suporte hidrofóbico, além disso, as duas lipases apresentam um modesto grau de ativação interfacial (BARBOSA et al., 2014; ERICSSON et al., 2008). Com isso, em baixa força iônica, como 5mM é considerado o melhor para a imobilização de CALA e CALB em QUI, a reação de ligação covalente de lipases em suportes hidrofóbicos pode promover a imobilização e estabilização da estrutura aberta das lipases covalente (RODRIGUES et al., 2019). Em alta força iônica (50 e 100 mM para o presente estudo), a conformação aberta da lipase seria desfavorecida, o que dificultaria a imobilização das lipases em quitosana via ligação covalente (MANOEL et al., 2015). Portanto a imobilização de CALA e CALB foi realizada principalmente por troca iônica e ativação interfacial.

Para a imobilização de CALA e CALB em quitosana, o tempo ( $p$ -valor = 0,930) e o pH ( $p$ -valor = 0,068) não foram parâmetros estaticamente significativos como é possível observar nas tabelas 11 e 12 e na Figura 12, e não contribuíram muito para o processo, quando comparados com a concentração de proteína e a força iônica, pois suas contribuições foram em torno de 0,02% para o tempo e de 12,00% para o pH. Quanto maior o tempo de imobilização por ligação covalente, conseqüentemente maior será a sua estabilidade térmica (ADRIANO et al., 2008). Apesar do tempo não ser um parâmetro estatisticamente significativo dentro do planejamento, foi possível obter um rendimento de imobilização de 80.00% em apenas 1 hora. O contrário do que foi obtido por Adriano et al., (2008), em seus estudos que no tempo de 24 horas alcançou um rendimento de 77.00%, para a imobilização de CALB em quitosana (ADRIANO et al., 2008). Pinheiro

et al., (2019), obteve um rendimento de imobilização de 68,13% e 79.37%, para os tempos de 24 e 48 horas, também para CALB imobilizada em quitosana (PINHEIRO et al., 2019).

Embora o pH não tenha exercido tanta influência na variável resposta (atividade do biocatalisador) o pH alcalino foi o que obteve o melhor resultado. Em muitos casos a imobilização é realizada em pH neutro, contudo, a imobilização em pHs alcalinos, no qual a reatividade dos nucleófilos das proteínas pode ser melhorada são empregados para alcançar uma elevada reação entre o suporte e a proteína (MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020).

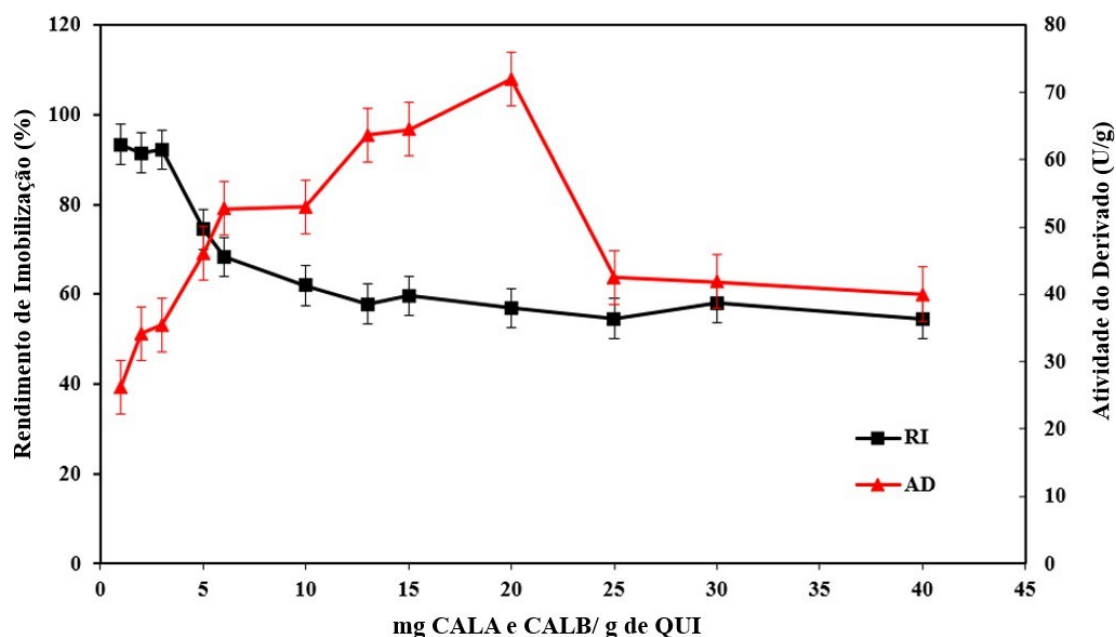
**Figura 12** - Superfícies de contorno para a imobilização de CALA-CALB-QUI. (A) Concentração de Proteína (mg /g) versus tempo (h). (B) Concentração de Proteína (mg /g) versus pH.



**Fonte:** Elaborado pela autora.

Buscando retirar o máximo de proveito da quitosana como suporte, o carregamento máximo de CALA e CALB foi testado em um ensaio de carga máxima. A Figura 13 apresenta o rendimento de imobilização e a atividade do biocatalisador em diferentes carregamentos de CALA e CALB (1:1 – 1:10 mg de CALA e CALB por grama de quitosana). Nesse sentido, o maior rendimento de imobilização (93,36%) foi alcançado para 1:1 mg/g, enquanto diminui com o aumento da carga de CALA e CALB na quitosana. A maior atividade do biocatalisador foi de (71,89 U/g) na carga de 20 mg/g, e reduziu nas cargas de 25, 30 e 40 mg/g. Uma carga de proteína maior pode ter aumentado a difusão do substrato, reduzindo o valor de atividade do biocatalisador (RIOS et al., 2019). Além do mais, cargas elevadas podem causar interações enzima-enzima, formando conglomerados e inibindo o alongamento flexível da conformação enzimática, resultando em impedimento estérico e inativação da enzima (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013).

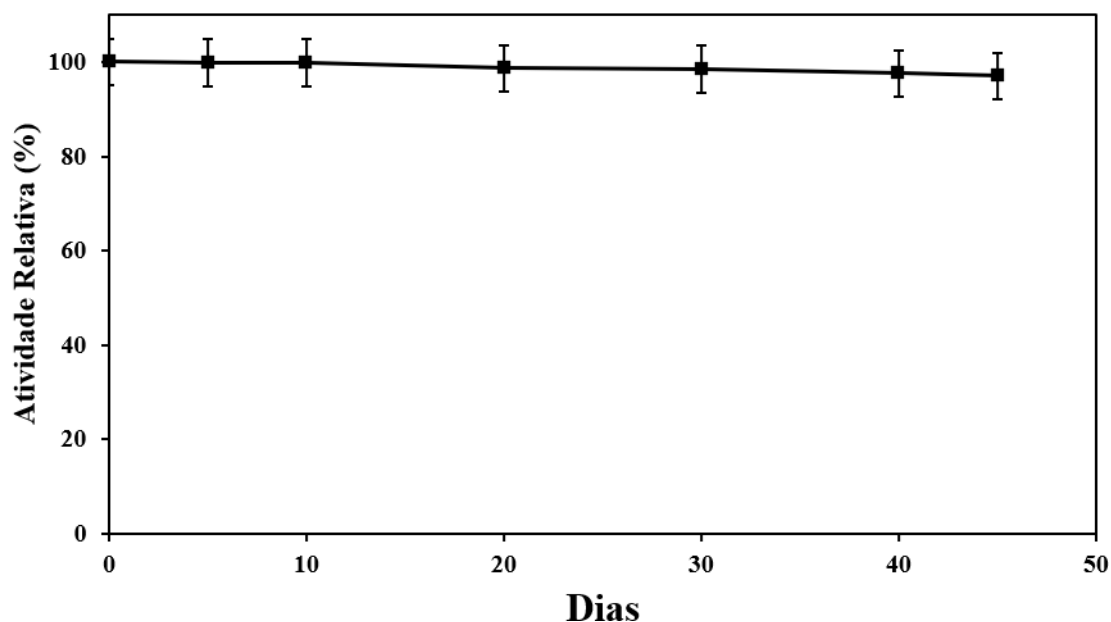
**Figura 13** - Capacidade de carga de quitosana para CALA e CALB em pH 9 (5 mM), por 1 hora.



Fonte: Elaborado pela autora.

A investigação da estabilidade de armazenamento foi realizada para analisar se o biocatalisador produzido neste estudo mantém sua atividade catalítica ao longo do tempo. A Figura 14 mostra a evolução da atividade do biocatalisador por 45 dias, e mostra que houve uma perda de apenas 2,97% de sua atividade catalítica.

**Figura 14** - Estabilidade de armazenamento da preparação CALA-CALB-QUI durante 45 dias.

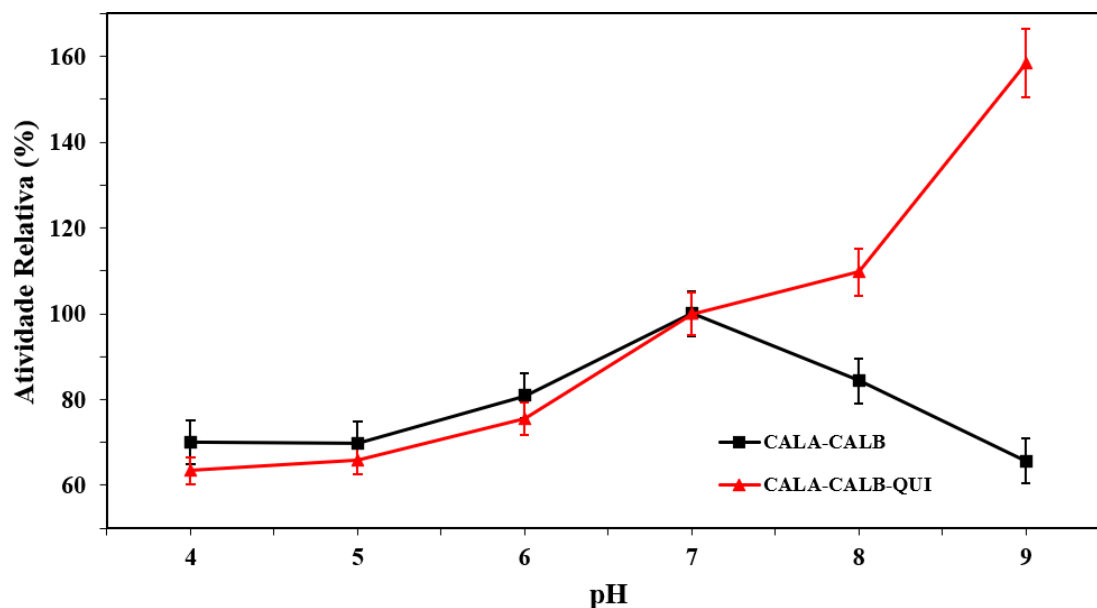


Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.7 Perfil de pH

O efeito do pH no desempenho de CALA e CALB (carga de enzima 1: 5 mg/mg) e CALA-CALB-QUI (6: 1 mg /g) foi avaliado a partir da faixa entre pH 5 e pH 9. Como pode ser visto em Na Figura 15, a mistura de CALA e CALB apresentou maior atividade em pH 7 e menor atividade em pHs mais ácidos e alcalinos. A literatura relata que a atividade mais alta para CALA solúvel está na faixa de pH 6,5c-c7 e para CALB em pH 7 (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019; GOTOR-FERNÁNDEZ; BUSTO; GOTOR, 2006; KIRK; CHRISTENSEN, 2002; KUMAR et al., 2019a; LIMA et al., 2019). Monteiro et al., (2019) em seus estudos, analisaram o efeito do pH na faixa de 5 a 9 sobre a atividade relativa do CALA, e obtiveram comportamento semelhante ao obtido no presente estudo (MONTEIRO et al., 2019b). Da mesma forma, os autores Yu et al., (2018), avaliaram em seus estudos o desempenho do CALB na faixa de pH (6-9) e também obtiveram comportamento semelhante ao obtido neste estudo (YU et al., 2018). Assim, mesmo sendo misturados, CALA e CALB desempenharam o mesmo papel quando analisados separadamente.

**Figura 15** - Efeito do pH (4-9, 5mM) nas atividades CALA-CALB e CALA-CALB-QUI.



Fonte: Elaborado pela autora.

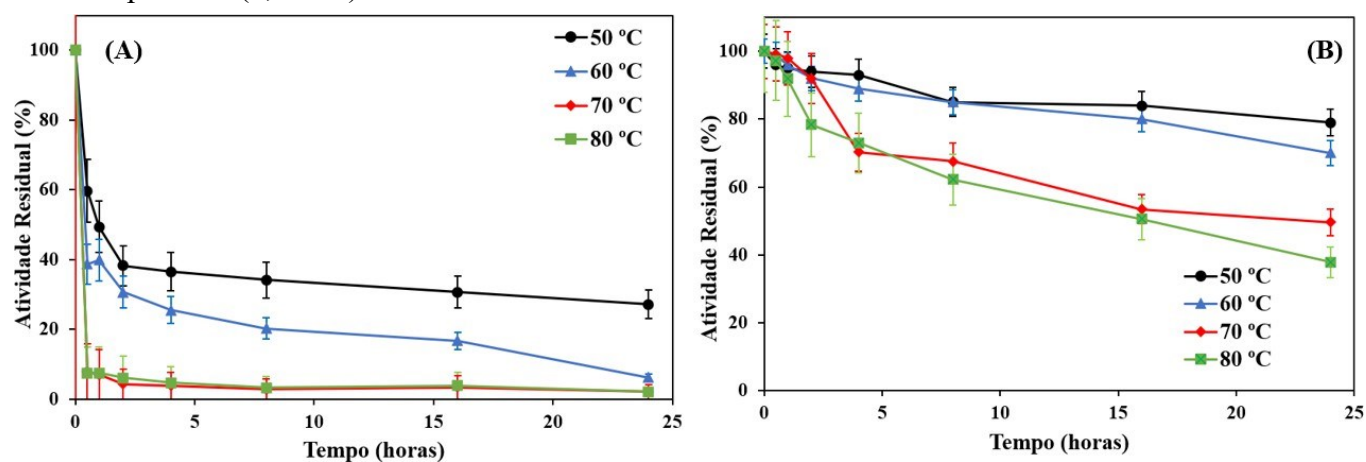
Em pH 7, CALA-CALB-QUI manteve a mesma atividade da mistura solúvel de CALA-CALB; entretanto, a atividade de CALA-CALB-QUI foi maior em pHs ácidos e alcalinos. De fato, em pH 9, a atividade de CALA-CALB-QUI foi 95% vezes maior do que a de CALA-CALB solúvel. Da mesma forma, CALA imobilizado em nanopartículas magnéticas revestidas com quitosana foi mais ativo do que CALA solúvel em todos os pHs em estudo (5-10) e CALB imobilizado em um polímero  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SiO}_x\text{-gP}$  (GMA) foi mais ativo na faixa de pH (6 -10) do que CALB solúvel, exceto em pH 7 para ambas as lipases (MONTEIRO et al., 2019b; YU et al., 2018). A mistura CALA-CALB-QUI apresentou excelente adaptação em diferentes pHs em comparação com a mistura de lipases livres. O carregador de quitosana desempenhou um papel importante na blindagem e proteção das moléculas de lipase, as interações iônicas da proteína com o suporte dependem do valor do pH. Este fato pode estar relacionado ao aumento da estabilidade da enzima ou alterações conformacionais durante o processo de imobilização (MELO et al., 2017; YU et al., 2018).

### 5.8 Desativação térmica

A mistura de CALA-CALB e CALA-CALB-QUI foi investigada para desativação térmica (50-80 °C). Como pode ser visto na Figura 16 (A), a estabilidade da mistura CALA-CALB foi maior na temperatura de 50 °C, assim como para CALA-CALB-QUI como pode ser visto na Figura 16 (B). De acordo com a Tabela 13, a meia-vida a 50 °C para CALA-CALB foi de 19,52 e 78,75 para CALA-CALB-QUI. Por outro

lado, a 80 °C CALA-CALB e CALA-CALB-QUI exibiram as menores estabilidade e meia-vida (8,25 e 19,41 horas, respectivamente). É possível observar que a constante de desativação de CALA-CALB reduziu com a imobilização e que a meia-vida do CALA-CALB-QUI foi de 2 a 6 vezes maior que a do CALA-CALB, além disso, o catalisador imobilizado foi mais estável do que o solúvel, especialmente nas temperaturas de 50 e 60 °C.

**Figura 16** - Atividade residual de CALA-CALB (A) e CALA-CALB-QUI (B) em diferentes temperaturas (50-80 °C) após a incubação (5 mM, pH 9) para o tempo específico (0,5-24h).



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados obtidos nas meias-vidas (Tabela 13) mostram que a imobilização otimizou as características das proteínas, uma vez que o biocatalisador imobilizado foi muito mais estável do que as enzimas livres. Pinheiro et al., (2019) analisaram a desativação térmica para CALB imobilizado em quitosana ativada com glutaraldeído e obtiveram meia-vida de 1,20 horas a uma temperatura de 60 °C, por 24 horas em pH 7 (PINHEIRO et al., 2019). Monteiro et al., (2019) obtiveram um tempo de meia-vida de 1,03 h em pH 7, a uma temperatura de 85 °C para a desativação térmica de CALA imobilizado em uma nanopartícula revestida com quitosana (MONTEIRO et al., 2019b). A metodologia de coimobilização utilizada neste trabalho foi por ligação covalente, que influenciou positivamente na estabilização do biocatalisador. A imobilização por ligação covalente que ocorre entre os grupos amino da quitosana e aldeído do glutaraldeído é irreversível e resiste a elevados valores de temperatura, consequentemente melhorando a estabilidade da enzima para sua aplicação (BERGER et al., 2004; MENDES et al., 2011b).



**Tabela 13** - Tempo de meia-vida de diferentes temperaturas CALA-CALB e CALA-CALB-QUI incubadas em tampão de fosfato de sódio (5mM, pH 7).

Temperatura (°C)	CALA-CALB	CALA-CALB-QUI
	t <sub>1/2</sub> (horas)	t <sub>1/2</sub> (horas)
50	19.52	78.75
60	8.41	50.95
70	8.45	34.28
80	8.25	19.41

Fonte: Elaborado pela autora.

### 5.9 Caracterização dos materiais

Informações relacionadas às ligações químicas presentes na estrutura da quitosana, bem como a interação com o glutaraldeído e enzimas foram analisadas por FTIR. Os modos vibracionais das amostras estão descritos na Figura 17 (A).

Conforme observado nos espectros da Figura 17 (A), as bandas principais evidenciadas em 3494 e 1597  $\text{cm}^{-1}$  referem-se às ligações do tipo N-H da quitosana pura e uma banda em 2879  $\text{cm}^{-1}$  em relação ao alongamento das ligações C-C (VARMA; VASUDEVAN, 2020). Vibrações a 1648  $\text{cm}^{-1}$  da amida II, 1151 e 1021  $\text{cm}^{-1}$  das ligações C-O para quitosana também foram identificadas (FREIRE et al., 2020; NOVAES et al., 2020). Duas bandas foram atribuídas em 2920 e 2878  $\text{cm}^{-1}$  (GREGORIO-JAUREGUI et al., 2012) próximas e sobrepostas em relação ao alongamento das ligações C-H, além das ligações O-H e N-H em 3500 e 3300  $\text{cm}^{-1}$  (PAWLAK; MUCHA, 2003; PINHEIRO et al., 2019) respectivamente.

A ligação covalente é a forma mais comum de imobilização. Vários suportes ativados, como a quitosana, associam as funções  $\text{NH}_2/\text{COOH}$  da lisina, arginina, ácido glutâmico ou aspártico na superfície da enzima para uma funcionalização do suporte com glutaraldeído (BARBOSA et al., 2014). A vibração de estiramento C–O das ligações glicosídicas foi observada em torno de 1075  $\text{cm}^{-1}$ . Uma supressão da banda característica de vibração da ligação  $\text{NH}_2$  foi observada em 1580  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo a eficácia da reação de reticulação entre o QUI-GLU (MONTEIRO et al., 2019b) (RASOULZADEH et al., 2019).

A intensidade da banda em 1622  $\text{cm}^{-1}$  é relativamente maior em QUI-GLU-CALA-CALA, sugerindo um ligeiro aumento na densidade do aglomerado de imina devido à reação de reticulação entre QUI e CALA (MONTEIRO et al., 2019b). Como

pode ser visto no espectro QUI-GLU-CALA-CALB, a CALB imobilizada apresentou modos vibracionais que podem ser indicados nas seguintes bandas:  $3425\text{ cm}^{-1}$  referente às ligações O-H devido à água e N-H associado ao CALB. Uma banda característica a  $1647\text{ cm}^{-1}$  de C=O correspondendo à amida I e a  $1550\text{ cm}^{-1}$ , correspondendo às bandas C-N da amida II (COŞKUN et al., 2021).

As estruturas cristalinas das amostras de QUITOSANA, QUI-GLU e QUI-GLU-CALA-CALB foram analisadas por XRPD. A Figura 17 (B) descreve os picos característicos da quitosana, que podem ser evidenciados em uma estrutura predominantemente amorfa do polímero, apresentando um pico mais intenso a  $20^\circ$ , indicando que a quitosana possui uma estrutura polimórfica de forma II (ZHANG et al., 2006). As reflexões cristalinas de 020, 110, 120, 101 e 130, correspondendo a  $2\theta$  de  $10,3^\circ$ ,  $19,8^\circ$ ,  $21,8^\circ$ ,  $26,2^\circ$  e  $29,3^\circ$  da amostra de quitosana, respectivamente (DE MENEZES et al., 2020; HAO et al., 2021)

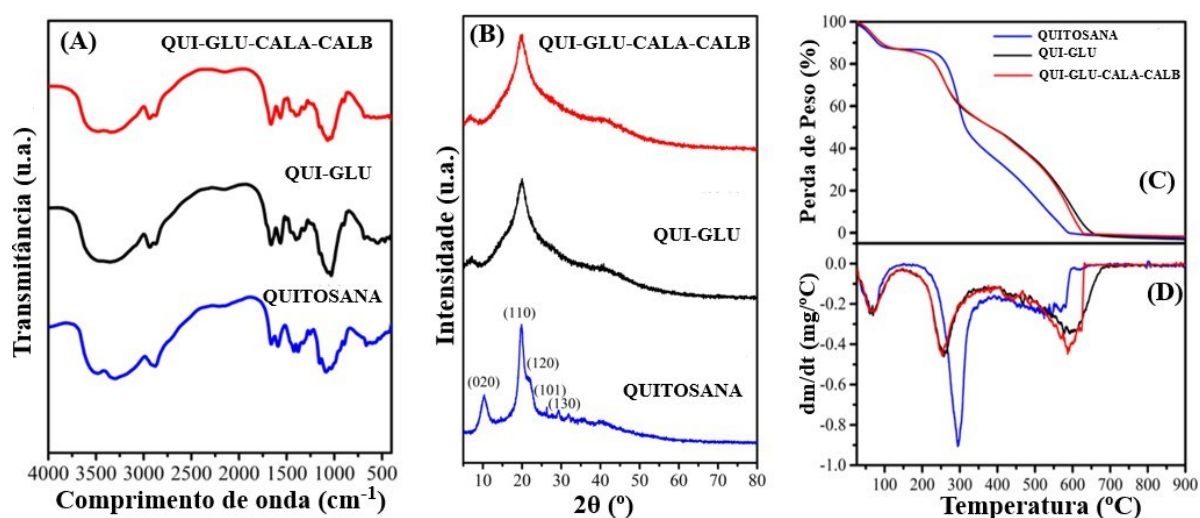
Os padrões de XRPD também indicaram que a quitosana contém grupos OH e  $\text{NH}_2$  que formam uma ligação de hidrogênio intermolecular. Isso promove uma estrutura polimérica amorfa devido à presença dessas funções orgânicas, conforme visto nos espectros de FTIR (EDDYA; TBIB; EL-HAMI, 2020). Foi possível observar que para amostras ativadas, como QUI-GLU e QUI-GLU-CALA-CALB, apresentaram alargamento do pico em  $20^\circ$ , bem como diminuição da intensidade do pico entre  $10\text{-}12^\circ$ . Este pico pode estar associado à estrutura cristalina da forma I (SAMUELS, 1981).

Os termogramas TGA e suas respectivas curvas derivadas (DTG) são representados na Figura 17 (C) e (D). Foi possível verificar a presença de dois eventos de degradação em todas as amostras. O primeiro descreve a temperatura máxima de  $125^\circ\text{C}$  e perda de peso em torno de 10-13%, o que pode estar relacionado à dessorção de água nas fibras poliméricas da quitosana na amostra de Quitosana (PINHEIRO et al., 2019). O mesmo evento pode ser visto em amostras QUI-GLU e QUI-GLU-CALA-CALB com faixas de temperatura muito próximas ocorrendo entre 25 e  $135^\circ\text{C}$  (13-14%) com uma perda de massa ligeiramente maior para essas amostras, respectivamente.

O segundo evento ocorreu entre  $135$  e  $232^\circ\text{C}$ , correspondendo à estabilidade térmica com baixa perda de massa (2,7%) para a amostra de Quitosana. Para amostras ativadas, este evento foi observado entre  $135$  e  $180^\circ\text{C}$  com perda de massa entre 2 - 3%, mas com uma faixa de temperatura menor, que apresentou maior degradação do material. Além do segundo evento térmico, as curvas DTG (Fig. 17 (D)) mostraram um perfil de

degradação com uma faixa de temperatura mais baixa das amostras ativadas em comparação com a amostra não modificada (QUITOSANA). Isso pode estar associado às ligações químicas da quitosana com o glutaraldeído e à imobilização das enzimas CALA e CALB. A reticulação de quitosana diminuiu a estabilidade térmica, o que pode ser observado nas curvas QUI-GLU e QUI-GLU-CALA-CALB. Os eventos térmicos continuam após 230 °C com uma perda de 85,36% até 590 °C para amostra pura e 84,3 - 85% para amostras ativadas (630 a 680 °C). Essa diferença entre a amostra não ativada e as demais está associada à presença do reticulador (glutaraldeído) e das enzimas CALA e CALB, o que possibilitou observar uma faixa de temperatura maior para a degradação térmica desses materiais.

**Figura 17** - (A) Espectros de FTIR de QUI-GLU-CALA-CALB, QUI-GLU e QUITOSANA. (B) padrões de XRD dos QUIs antes e depois da imobilização de CALA e CALB. (C) Perfis de termodegradação (TGA). (D) Curvas DTG de QUI-GLU-CALA-CALB e seus componentes individuais.



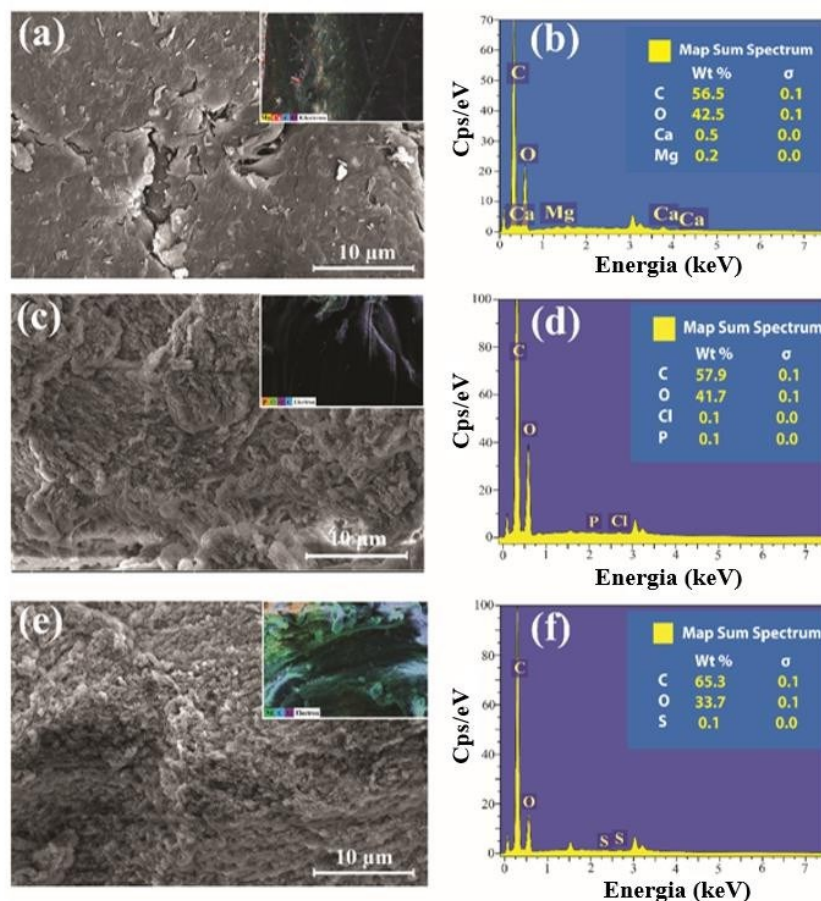
Fonte: Elaborado pela autora.

Micrografias de amostras de Quitosana, QUI-GLU e QUI-GLU-CALA-CALB, além dos mapas EDS (inserções) foram apresentadas na Figura 18 (a), (c) e (e),

respectivamente, descrevendo a morfologia da superfície também como a porosidade comumente encontrada neste polímero (suporte) (CHAVES et al., 2021). Os espectros de EDS foram apresentados na Figura 18 (b), (d) e (f) com variações discretas das composições elementares. Os elementos Ca e Mg (Figura 18 (b)) ocorrem devido ao processo de solubilização e neutralização da quitosana. Na Figura 18 (d) os elementos P e Cl mostraram o resultado da ativação com Glutaraldeído em solução tampão. Além disso, a presença dos elementos de enxofre com a imobilização de enzimas (Figura 18 (f)) indica a presença de CALA e CALB na superfície do suporte, que possui este elemento nos aminoácidos que os compõem (BOURNE et al., 1994; PINHEIRO et al., 2019). Também foi possível observar o aumento na proporção dos elementos carbono e oxigênio indicando o aumento da porção orgânica no material de suporte pela adição de glutaraldeído e enzimas.

Foi possível observar a mudança na superfície da quitosana após a reticulação com glutaraldeído, aumentando a rugosidade e a porosidade. As Figuras 18 (e) e (f) indicam uma maior porcentagem de carbono para a amostra QUI-GLU-CALA-CALB. Assim, é possível atribuir esse fenômeno à presença de enzimas cobrindo parcialmente a superfície do suporte (BONAZZA et al., 2018).

**Figura 18** - Micrografias MEV de amostras /mapas EDS (inserção) de (a) QUITOSANA, (c) QUI-GLU e (e) QUI-GLU-CALA-CALB. Espectros elementares de amostras (b) QUITOSANA, (d) QUI-GLU e (f) QUI-GLU-CALA-CALB.



Fonte: Elaborado pela autora.

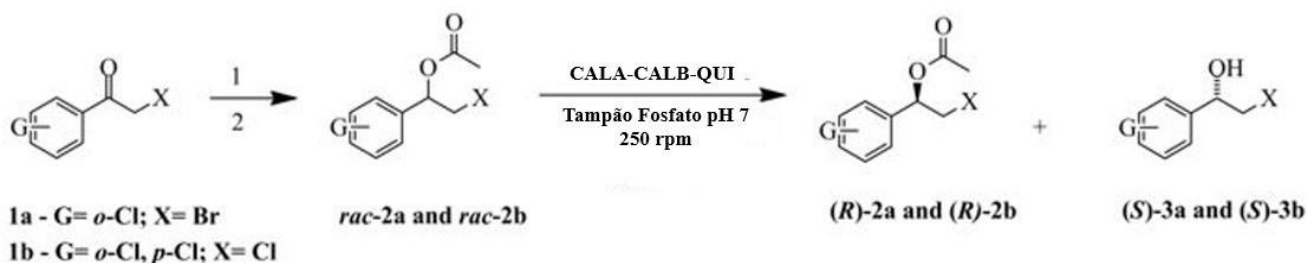
### 5.10 Análise de halodrinas acetatos 2a-b e halodrinas 3a-b

Inicialmente, foram realizadas reduções químicas das cetonas **1a** e **1b**, seguidas de reações de acetilação de halodrinas para obtenção dos ésteres racêmicos **2a** e **2b**. Esses procedimentos foram realizados de acordo com as metodologias descritas por (FONSECA et al., 2018). Métodos quirais de GC foram desenvolvidos para *rac*-**2a-b** e *rac*-**3a-b** para medir de forma confiável os excessos enantioméricos dos substratos restantes de **2a-b** e os produtos finais de **3a-b** na resolução catalisada por CALA-CALB-QUI de *rac*-**2a-b**.

Em seguida, os ésteres racêmicos **2a** e **2b** foram resolvidos por meio da reação de hidrólise usando CALA-CALB-QUI na presença de tampão fosfato de pH 7, levando aos (*R*)-ésteres (**2a** e **2b**) e (*S*)-halodrinas restantes (**3a** e **3b**) (Figura 19). Vale ressaltar que as configurações desses ésteres e halodrinas foram determinadas por meio de dados de rotações ópticas específicas obtidas por meio de um polarímetro em comparação com os relatados na literatura.

Os resultados obtidos nas resoluções cinéticas de **2a** e **2b**, via reação de hidrólise, na presença de CALA-CALB-QUI estão resumidos na Tabela 14.

**Figura 19** - Resolução cinética, via reação de hidrólise, de ésteres racêmicos **2a** e **2b** usando CALA-CALB-QUI.



**Reagentes e condições:** (1) NaBH<sub>4</sub>; MeOH; 4 °C por 10 min; r.t. por 30 min (2) Ac<sub>2</sub>O; DMAP; Et<sub>3</sub>N; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>; r.t. ; 2 h. A resolução cinética do éster **2a** foi realizada usando 20% de THF como cossolvente.

**Fonte:** Elaborado pela autora.

**Tabela 14** – Resultados da resolução cinética de *rac*-2a e *rac*-2b usando CALA-CALB-QUI

Entrada	Ester	Tempo (h)	Temperatura (°C)	<i>e.e.s</i> (%) <sup>a</sup>	<i>e.e.p</i> (%) <sup>a</sup>	<i>c</i> (%) <sup>b</sup>	E <sup>c</sup>
1	<i>rac</i> -2a	48	30	1	3	30	1
2	<i>rac</i> -2a	48	40	1	1	53	1
3	<i>rac</i> -2a	48	50	35	79	30	12
4	<i>rac</i> -2b	24	40	24	>99	19	>200
5	<i>rac</i> -2b	30	40	84	98	46	>200

<sup>a</sup> Determinado por CG;

<sup>b</sup> Conversão,  $c = e.e.(R)/(e.e.(R)+e.e.(S))$ ;

<sup>c</sup> Razão enantiomérica,  $E = \ln[1-c(1+e.e.(S))]/\ln[1-c(1-e.e.(S))]$ .

**Fonte:** Elaborado pela autora.

A resolução enzimática do éster **2a** em 48 h a 30 e 40 °C levou a baixos valores de excesso enantiomérico tanto do éster (*R*)-**2a** remanescente quanto da bromidrina (*S*)-**3a** (entradas 1 e 2). Quando a temperatura foi elevada para 50 °C no tempo de reação de 48 h, houve um aumento nos valores de excesso enantiomérico tanto do acetato **2a** remanescente quanto da bromidrina **3a**, com uma conversão de 30% (entrada 3). Em relação à resolução cinética enzimática do éster **2b**, elevados valores de razão enantiomérica ( $E > 200$ ) foram obtidos nos dois tempos de reação (24 e 30 h) e na temperatura de 40 °C (entradas 4 e 5). Com o aumento do tempo de reação para 30 h, a

razão enantiomérica permaneceu  $> 200$ , com valores de excesso enantiomérico de 84% para o (*R*)-acetato **2b** restante e 98% para (*S*)-clorohidrina **3b** e conversão (46%) (entrada 5). Esses resultados são considerados satisfatórios em uma resolução cinética enzimática.

### 5.11 Análise do *docking* molecular

Com base na literatura (ALMEIDA et al., 2020) e com algumas adaptações (FONSECA et al., 2020a), este estudo de simulação de acoplamento molecular foi utilizado para elucidar a reação de interação de hidrólise entre os acetatos de  $\beta$ -haloidrina e CALA:CALB lipases.

Por meio da molécula de *docking* do Autodock vina, foi possível listar a afinidade e as energias RMSD dos ligantes, conforme mostrado na Tabela 15.

**Tabela 15** – Resultado das pontuações com o *docking* molecular.

Compostos	Afinidade de Energia (Kcal/mol)	RMSD	Lipase
$\beta$ - acetato de bromoidrina	-4.9	$<2.0 \text{ \AA}$	CALA
$\beta$ - acetato de bromoidrina	-6.1	$<2.0 \text{ \AA}$	
$\beta$ - acetato de bromoidrina	-6.1	$<2.0 \text{ \AA}$	CALB
$\beta$ - acetato de bromoidrina	-6.0	$<2.0 \text{ \AA}$	

Fonte: Elaborado pela autora.

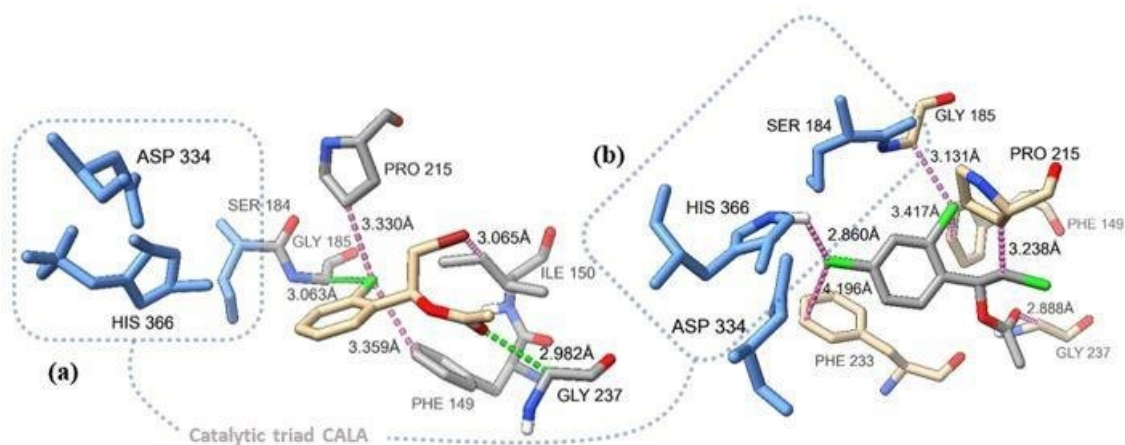
Embora todos se aloquem na mesma região do sítio ativo da proteína, que geralmente é constituída pela tríade catalítica (Ser-His-Asp), no caso da lipase CALA, a simulação sugere uma composição de Ser184, His366 e Asp334, (SANDSTRÖM et al., 2009) e para o CALB, os resíduos Asp187-His224-Ser105 (CEN et al., 2019).

Os NACs são definidos como compatíveis com as conformações com o ataque do sítio catalítico ao carbono eletrofilico do grupo acila (BRUICE; LIGHTSTONE, 1999). Em um NAC típico, a distância entre o oxigênio do resíduo Ser 184 (CALA)/ Ser105 (CALB) e o carbono da carbonila geralmente tem cerca de  $3 \text{ \AA}$  de comprimento, e os mesmos átomos, juntamente com a molécula de oxigênio da carbonila, tendem a formar um ângulo de aproximadamente  $60^\circ$ , com um máximo de  $90^\circ$  (CORICI et al., 2015).

Nesta simulação, para a lipase CALA, nenhuma característica foi observada em todas as dez poses de cada substrato que configura um NAC, mas as melhores interações da pose considerada mais próxima do sítio ativo da enzima são mostradas. Para

o acetato de  $\beta$ -bromoidrina, como mostrado na Figura 20, há uma aproximação hidrofílica com o Gly185 (3,063Å), próximo à tríade catalítica, e Gly237 (2,982Å). Uma abordagem hidrofóbica para Pro215 (3,3Å), com halogênio do substrato. Além disso, duas aproximações do tipo alquil, de natureza hidrofóbica, são observadas em Ile150 (3,1Å), com bromo e Phe149 (3,3Å). Por fim, é possível observar para o acetato de  $\beta$ -clorohidrina as interações dos resíduos da tríade catalítica em His366 (2,86Å), de natureza hidrofílica, na região hidrofóbica. Além da presença dos resíduos Phe233, Gly237, Pro 215, Gly 185 e Phe 149, com o tipo de alquil da interação.

**Figura 20 - (a)** O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp334-His366-Ser184 (azul) e as interações de resíduos do acetato de  $\beta$ -bromoidrina. **(b)** O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp334-His366-Ser184 (azul) e as interações de resíduos do acetato de  $\beta$ -cloroidrina.



Fonte: Elaborado pela autora.

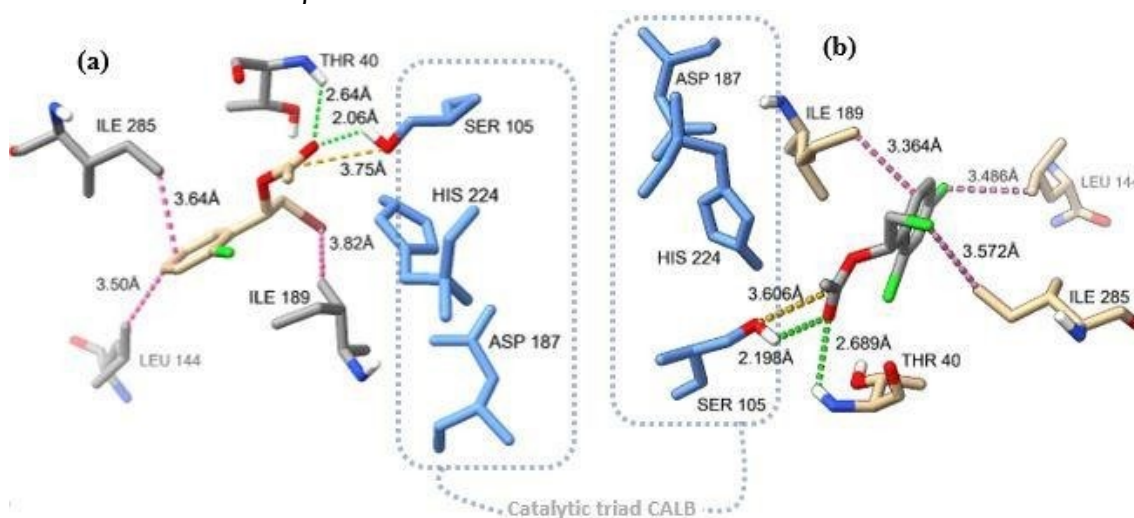
Nesta simulação, para a lipase CALB, os resultados mostraram uma aproximação do sítio catalítico da lipase com a região onde seria realizada a hidrólise. As 10 posições de acoplamento foram, portanto, classificadas como NACs fracos porque a distância Ser-O (105) e a carbonila-C do substrato estavam acima de 3,2 Å (Figura 12), com um ângulo menor que 60 ° (FONSECA et al., 2020b).

Para o acetato de  $\beta$ -bromohidrina, conforme apresentado na Figura 21, o <UNK>-acetato de bromoidrina apresentou uma aproximação hidrofílica com a Ser105 (2,063Å) formando uma interação de ligação H na tríade catalítica do Thr40 (2,64Å), e também uma Ligação H com o grupo carbonila do oxigênio. Uma abordagem hidrofóbica para Ile285 (3,3Å) e Leu144 (3,05Å), com o anel aromático do substrato. Além disso, uma aproximação do tipo alquil de natureza hidrofóbica foi observada em Ile189 (3,82Å), com bromo. Finalmente, é possível observar para o acetato de  $\beta$ -clorohidrina as interações



dos resíduos da tríade catalítica em Ser105 (2,2Å), formando uma tríade catalítica de ligação H, e o Thr40 (2,68Å), também uma ligação H com o grupo carbonila do oxigênio. Além da presença de resíduos Ile189 (3,36Å), Ile285 (3,6Å), no anel aromático, uma interação de resíduo com Leu144 (3,5Å) no clorin, tipo alquil.

**Figura 21 - (a)** O sítio ativo da lipase CALB com a tríade catalítica Asp187-His224-Ser105 (azul) e as interações de resíduos de acetato de  $\beta$ -bromoidrina. **(b)** O sítio ativo da lipase CALA com a tríade catalítica Asp187-His224-Ser105 (azul) e as interações de resíduos do acetato de  $\beta$ -clorohidrina.



Fonte: Elaborado pela autora.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na primeira etapa, a imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) em nanopartículas magnéticas revestidas com 3-aminopropiltriétoxissilano produziu o biocatalisador Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @APTES-RML (RML-NPM). O biocatalisador foi analisado quanto aos parâmetros de imobilização obtidos (94,7% ± 1,0 para rendimento de imobilização e 341,3 ± 1,2 U/g para atividade derivada), desativação térmica e de pH que resultou em um tempo de meia-vida 16 vezes maior para a enzima imobilizada (RML-NPM) em comparação com RML livre. O desempenho do protocolo de imobilização utilizado foi confirmado por análises de FTIR, XRPD e TEM. O RML-NPM foi estudado e otimizado na síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos a partir dos ácidos graxos do óleo de babaçu residual, sob condições otimizadas de reação para aumentar a conversão em ésteres etílicos de ácidos graxos. As condições de reação foram determinadas pela metodologia de Taguchi, na qual foi possível obter uma conversão de 81,7 ± 0,7% nas condições (5% m /m) de RML-NPM, 1: 1 (AGLs/álcool), 40 °C e 6 horas). Assim, o RML-NPM é uma alternativa na produção de ésteres etílicos de ácidos graxos, pois possui especificidade para o substrato e pode ser facilmente recuperado da reação quando exposto a um campo magnético.

Na segunda etapa, a coimobilização por ligação covalente foi realizada com sucesso entre as lipases A de *Candida antarctica* (CALA) e a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em quitosana (QUI). Utilizando o método de Taguchi, foi possível otimizar - 97,1 ± 0,01% para o rendimento de imobilização e 46,01 ± 0,35 U /g para a atividade derivada em pH 9,5 mM por 1 hora de imobilização com uma carga de proteína mg/g de suporte (6 :1) - e determinar os fatores que mais contribuíram para o processo de imobilização, que foram concentração de proteína e força iônica. Além disso, o processo de imobilização foi capaz de melhorar a estabilidade térmica da mistura CALA-CALB e aumentar sua atividade nos pHs em estudo, exceto para o pH 7. A caracterização física dos materiais (XRPD, FTIR, MEV, TGA e EDS) comprovou que a imobilização de CALA e CALB em quitosana ocorreu com sucesso. O derivado CALA-CALB-QUI se mostrou eficiente na resolução cinética dos halohidrinatos acetatos **2a** e **2b**, proporcionando as (*S*)-halohidrinatos **3a** e **3b** em altos valores de excesso enantiomérico e conversão. Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que a quitosana é um suporte estável e promissor para a produção de um novo biocatalisador coimobilizado com duas lipases.

---

Com isso, as técnicas de imobilização e os materiais utilizados como suporte investigados melhoraram a atividade catalítica a estabilidade térmica e operacional das lipases solúveis (RML, CALA e CALB). De fato, o biocatalisador RML-NPM foi capaz de catalisar um substrato heterogêneo (como o óleo de babaçu residual para a produção de ésteres etílicos), e o biocatalisador CALA-CALB-QUI foi eficiente na resolução cinética de halohidrinias acetatos **2a** e **2b**.

---

## REFERÊNCIAS

- ABBASZAADEH, A. et al. Current biodiesel production technologies: A comparative review. **Energy Conversion and Management**, v. 63, p. 138–148, nov. 2012.
- ABDUL MANAN, F. M. et al. *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on reinforced chitosan–chitin nanowhiskers support for synthesis of eugenyl benzoate. **Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 92–102, jan. 2018.
- ACHARYA, N. et al. A comparative study of stability characteristics of mahua and jatropha biodiesel and their blends. **Journal of King Saud University - Engineering Sciences**, v. 31, n. 2, p. 184–190, abr. 2019.
- ADAM, W.; BLANCAFORT, L.; SAHA-MÖLLER, C. R. Kinetic resolution of racemic halohydrins, precursors of optically active di- and trialkyl-substituted epoxides, with lipase from *Pseudomonas* sp. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 8, n. 19, p. 3189–3192, out. 1997.
- ADAMCZAK, M.; BEDNARSKI, W. Enhanced activity of intracellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 11, p. 1347–1361, jul. 2004.
- ADNAN, M. et al. X-Shaped ZIF-8 for Immobilization *Rhizomucor miehei* Lipase via Encapsulation and Its Application toward Biodiesel Production. **Catalysts**, v. 8, n. 3, p. 96, 28 fev. 2018.
- ADRIANO, W. S. et al. Adsorption of amoxicillin on chitosan beads: Kinetics, equilibrium and validation of finite bath models. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 2, p. 132–137, dez. 2005.
- ADRIANO, W. S. et al. Improving the Properties of Chitosan as Support for the Covalent Multipoint Immobilization of Chymotrypsin. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 8, p. 2170–2179, ago. 2008.
- AFJEH, M. E. A. et al. Use of Glucose Oxidase Immobilized on Magnetic Chitosan Nanoparticles in Probiotic Drinking Yogurt. **Food Science of Animal Resources**, v. 39, n. 1, p. 73–83, fev. 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, nov. 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. **Renewable Energy**, v. 113, p. 112–118, dez. 2017.

---

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574–581, jan. 2019.

AHMAD, M.; MANZOOR, K.; IKRAM, S. Chitosan nanocomposites for bone and cartilage regeneration. In: **Applications of Nanocomposite Materials in Dentistry**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 307–317.

AISSAOUI, N. et al. Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: Influence of the crosslinking agent. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 6–7, p. 336–343, maio 2013.

AKINTUNDE, A. M.; AJALA, S. O.; BETIKU, E. Optimization of Bauhinia monandra seed oil extraction via artificial neural network and response surface methodology: A potential biofuel candidate. **Industrial Crops and Products**, 2015.

AKOPOVA, T. A. et al. Solvent-free synthesis and characterization of allyl chitosan derivatives. **RSC Advances**, v. 9, n. 36, p. 20968–20975, 2019.

ALI, M.; ISHQI, H. M.; HUSAIN, Q. Enzyme engineering: Reshaping the biocatalytic functions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 117, n. 6, p. 1877–1894, 27 jun. 2020.

ALI, Z. et al. Synthesis of fibrous and non-fibrous mesoporous silica magnetic yolk–shell microspheres as recyclable supports for immobilization of *Candida rugosa* lipase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 103, p. 42–52, ago. 2017.

ALMEIDA, L. C. et al. Enzymatic transesterification of coconut oil by using immobilized lipase on biochar: An experimental and molecular docking study. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. 1–8, 2020.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531–568, set. 2006.

AMINI, Z. et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339–353, 2017.

ANDRADE NETO, D. M. et al. Rapid Sonochemical Approach Produces Functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles with Excellent Magnetic, Colloidal, and Relaxivity Properties for MRI Application. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 121, n. 43, p. 24206–24222, out. 2017.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Bioaffinity based immobilization of almond (*Amygdalus communis*)  $\beta$ -galactosidase on con A-layered calcium alginate-cellulose beads: Its application in lactose hydrolysis in batch and continuous mode. **Iranian Journal of**

---

**Biotechnology**, v. 9, n. 4, p. 290–301, 2011.

ARANA-PEÑA, S. et al. Enzyme co-immobilization: Always the biocatalyst designers' choice...or not? **Biotechnology Advances**, p. 107584, jul. 2020a.

ARANA-PEÑA, S. et al. Multi-Combilipases: Co-Immobilizing Lipases with Very Different Stabilities Combining Immobilization via Interfacial Activation and Ion Exchange. The Reuse of the Most Stable Co-Immobilized Enzymes after Inactivation of the Least Stable Ones. **Catalysts**, v. 10, n. 10, p. 1207, 19 out. 2020b.

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, fev. 2021.

ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): Comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. **Biotechnology Progress**, v. 35, n. 1, 2019.

ARUMUGAM, A.; PONNUSAMI, V. Production of biodiesel by enzymatic transesterification of waste sardine oil and evaluation of its engine performance. **Heliyon**, 2017.

ASLAM, S. et al. Immobilization of *Pleurotus nebrodensis* WC 850 laccase on glutaraldehyde cross-linked chitosan beads for enhanced biocatalytic degradation of textile dyes. **Journal of Water Process Engineering**, v. 40, p. 101971, abr. 2021.

BABAKI, M. et al. Process optimization for biodiesel production from waste cooking oil using multi-enzyme systems through response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 105, p. 465–472, maio 2017.

BABICH, L. et al. Synthesis of Carbohydrates in a Continuous Flow Reactor by Immobilized Phosphatase and Aldolase. **ChemSusChem**, v. 5, n. 12, p. 2348–2353, dez. 2012.

BAJAJ, A. et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 1, p. 9–14, jan. 2010.

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, ago. 2012.

BARBOSA, O. et al. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 12 ago. 2013.

---

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

BEAUFILS, C. et al. From Enzyme Stability to Enzymatic Bioelectrode Stabilization Processes. **Catalysts**, v. 11, n. 4, p. 497, 14 abr. 2021.

BELL, E. L. et al. Biocatalysis. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, p. 46, 24 dez. 2021.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, jan. 2004.

BERGTHORSON, J. M. et al. Biodiesel – An Integrated Approach for a Highly Efficient Biofuel. In: **Comprehensive Biotechnology**. [s.l.] Elsevier, 2011. p. 87–99.

BERMAN, H. M. et al. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 235–242, 2000.

BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 877–882, ago. 2006.

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. R. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 27, n. 1, p. 95–114, jan. 2010.

BETIGERI, S. S.; NEAU, S. H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, v. 23, n. 17, p. 3627–3636, set. 2002.

BEZERRA, C. S. et al. Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. n/a–n/a, 10 jul. 2015.

BEZERRA, R. M. et al. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 125, p. 104–115, set. 2017.

BILAL, M. et al. Enhanced bio-catalytic performance and dye degradation potential of chitosan-encapsulated horseradish peroxidase in a packed bed reactor system. **Science of The Total Environment**, v. 575, p. 1352–1360, jan. 2017.

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

BILAL, M. et al. Modifying bio-catalytic properties of enzymes for efficient biocatalysis:

---

a review from immobilization strategies viewpoint. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 37, n. 3, p. 159–182, 4 maio 2019.

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, set. 2021.

BILGIN SIMSEK, E.; SALOGLU, D. Exploring the structural and catalytic features of lipase enzymes immobilized on g-C<sub>3</sub>N<sub>4</sub>: A novel platform for biocatalytic and photocatalytic reactions. **Journal of Molecular Liquids**, v. 337, p. 116612, set. 2021.

BINI, R. A. et al. Synthesis and functionalization of magnetite nanoparticles with different amino-functional alkoxy silanes. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 4, p. 534–539, fev. 2012.

BIOVIA. **Dassault Systemes BIOVIA, Discovery Studio Modelling Environment, Release 4.5** Accelrys Software Inc. San Diego, 2015.

BOEL, E. et al. Rhizomucor miehei triglyceride lipase is synthesized as a precursor. **Lipids**, v. 23, n. 7, p. 701–706, jul. 1988.

BOLIVAR, J. M. et al. The co-operative effect of physical and covalent protein adsorption on heterofunctional supports. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 7, p. 757–763, jul. 2009.

BOLIVAR, J. M.; NIDETZKY, B. The Microenvironment in Immobilized Enzymes: Methods of Characterization and Its Role in Determining Enzyme Performance. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3460, 24 set. 2019.

BONAZZA, H. L. et al. Operational and Thermal Stability Analysis of Thermomyces lanuginosus Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 184, n. 1, p. 182–196, 29 jan. 2018.

BORRELLI, G.; TRONO, D. Recombinant Lipases and Phospholipases and Their Use as Biocatalysts for Industrial Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 20774–20840, 1 set. 2015.

BOUDRANT, J.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Parameters



---

necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66–80, mar. 2020.

BOURNE, Y. et al. Horse Pancreatic Lipase. **Journal of Molecular Biology**, v. 238, n. 5, p. 709–732, maio 1994.

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, maio 1976.

BRADY, L. et al. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. **Nature**, v. 343, n. 6260, p. 767–770, fev. 1990.

BRAHAM, S. A. et al. Effect of Concentrated Salts Solutions on the Stability of Immobilized Enzymes: Influence of Inactivation Conditions and Immobilization Protocol. **Molecules**, v. 26, n. 4, p. 968, 12 fev. 2021.

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: [s.l: s.n.]. p. 15–31.

BRUCE, I. J.; SEN, T. Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. **Langmuir**, v. 21, n. 15, p. 7029–7035, jul. 2005.

BRUCE, T. C.; LIGHTSTONE, F. C. **Ground state and transition state contributions to the rates of intramolecular and enzymatic reactions** **Accounts of Chemical Research**, 1999.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, v. 351, n. 6326, p. 491–494, jun. 1991.

CACICEDO, M. L. et al. Immobilized Enzymes and Their Applications. In: **Advances in Enzyme Technology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 169–200.

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, dez. 2013.

---

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.

CAO, L.; LANGEN, L. VAN; SHELDON, R. A. Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387–394, ago. 2003.

CARVALHO, A. et al. Recent Advances in Lipase-Mediated Preparation of Pharmaceuticals and Their Intermediates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29682–29716, 11 dez. 2015.

CAVALCANTE, F. T. T. et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, v. 288, p. 119577, mar. 2021.

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, v. 215, p. 705–713, mar. 2018.

CEN, Y. et al. Artificial cysteine-lipases with high activity and altered catalytic mechanism created by laboratory evolution. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, 2019.

CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 491–499, jan. 2013.

CHANDRA, P. et al. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 1, p. 169, 26 dez. 2020.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, 5 jun. 2018.

CHAVAN, S.; GAIKWAD, A. Optimization of enzymatic hydrolysis of bamboo biomass for enhanced saccharification of cellulose through Taguchi orthogonal design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 1, p. 104807, fev. 2021.

CHAVES, A. V. et al. Hydroxyapatite-Based Magnetic Bionanocomposite as Pharmaceuticals Carriers in Chitosan Scaffolds. **Journal of Composites Science**, v. 5, n. 2, p. 37, 21 jan. 2021.

CHEN, X. et al. Biodiesel Production Using Lipases. In: **Lipid Modification by Enzymes and Engineered Microbes**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 203–238.

CHEN, Z. et al. Synthesis of amine-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@C nanoparticles for lipase

immobilization. **J. Mater. Chem. A**, v. 2, n. 43, p. 18339–18344, 4 set. 2014.

CHENG, C. et al. Elucidation of lid open and orientation of lipase activated in interfacial activation by amphiphilic environment. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1211–1217, nov. 2018.

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

CHOI, N. et al. In situ lipase-catalyzed transesterification in rice bran for synthesis of fatty acid methyl ester. **Industrial Crops and Products**, v. 120, p. 140–146, set. 2018.

CHOJNACKA, A.; GŁADKOWSKI, W. Production of Structured Phosphatidylcholine with High Content of Myristic Acid by Lipase-Catalyzed Acidolysis and Interesterification. **Catalysts**, v. 8, n. 7, p. 281, 14 jul. 2018.

CHOZHAVENDHAN, S. et al. A review on influencing parameters of biodiesel production and purification processes. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 1–2, p. 1–6, fev. 2020.

CLAASSEN, C.; GERLACH, T.; ROTHER, D. Stimulus-Responsive Regulation of Enzyme Activity for One-Step and Multi-Step Syntheses. **Advanced Synthesis & Catalysis**, p. adsc.201900169, 15 abr. 2019.

CORICI, L. et al. Understanding Potentials and Restrictions of Solvent-Free Enzymatic Polycondensation of Itaconic Acid: An Experimental and Computational Analysis. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 357, n. 8, p. 1763–1774, 2015.

COŞKUN, G. et al. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase on Nanomaterials and Investigation of the Enzyme Activity and Enantioselectivity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 193, n. 2, p. 430–445, 6 fev. 2021.

COWAN, D. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 4, p. 326–346, set. 2011.

CUI, C. et al. Improving the activity and stability of *Yarrowia lipolytica* lipase Lip2 by immobilization on polyethyleneimine-coated polyurethane foam. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 91, p. 59–66, jul. 2013.

CUI, J. et al. Hybrid Cross-Linked Lipase Aggregates with Magnetic Nanoparticles: A Robust and Recyclable Biocatalysis for the Epoxidation of Oleic Acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 38, p. 7179–7187, 28 set. 2016.

---

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 Biotech**, v. 3, n. 1, p. 1–9, 6 fev. 2013.

DAVE, R.; MADAMWAR, D. Esterification in organic solvents by lipase immobilized in polymer of PVA–alginate–boric acid. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 4, p. 951–955, abr. 2006.

DE ABREU, L. et al. Efficient purification-immobilization of an organic solvent-tolerant lipase from *Staphylococcus warneri* EX17 on porous styrene-divinylbenzene beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 51–55, jan. 2014.

DE ALBUQUERQUE, T. L. et al. Ion exchange of  $\beta$ -galactosidase: The effect of the immobilization pH on enzyme stability. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 7, p. 875–880, jul. 2016.

DE LATHOUDER, K. M. et al. Polyethyleneimine (PEI) functionalized ceramic monoliths as enzyme carriers: Preparation and performance. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 50, n. 1, p. 20–27, jan. 2008.

DE MENEZES, F. L. et al. From Magneto-Dielectric Biocomposite Films to Microstrip Antenna Devices. **Journal of Composites Science**, v. 4, n. 4, p. 144, 24 set. 2020.

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

DE REGIL, R.; SANDOVAL, G. Biocatalysis for Biobased Chemicals. **Biomolecules**, v. 3, n. 4, p. 812–847, 17 out. 2013.

DE 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, ago. 2016.

DE SOUZA, T. C. et al. Modulation of lipase B from *Candida antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanyl acetate. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 12, p. 2253–2268, 28 dez. 2020.

- 
- DEMAIN, A. L.; ADRIO, J. L. Contributions of Microorganisms to Industrial Biology. **Molecular Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 41–55, 4 jan. 2008.
- DIAS, R.; DE AZEVEDO JR., W. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**, v. 9, n. 12, p. 1040–1047, 1 dez. 2008.
- DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Reviews in Microbiology**, 1999.
- DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Biotechnological applications of *Candida antarctica* lipase A: State-of-the-art. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 37, n. 1–6, p. 36–46, dez. 2005.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015a.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015b.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Characterization of supports activated with divinyl sulfone as a tool to immobilize and stabilize enzymes via multipoint covalent attachment. Application to chymotrypsin. **RSC Advances**, v. 5, n. 27, p. 20639–20649, 2015c.
- DOS SANTOS, J. C. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015d.
- DOS 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, mar. 2017.
- DU, K. et al. Specific Ligation of Two Multimeric Enzymes with Native Peptides and Immobilization with Controlled Molar Ratio. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 4, p. 1166–1175, 19 abr. 2017.

---

DUARTE, J. G. et al. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. **Fuel**, v. 177, p. 123–129, ago. 2016.

DURAIARASAN, S. et al. Direct conversion of lipids from marine microalga *C. salina* to biodiesel with immobilised enzymes using magnetic nanoparticle. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 1, p. 1393–1398, mar. 2016.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. NNScore: A neural-network-based scoring function for the characterization of protein-ligand complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 10, p. 1865–1871, 2010.

DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. NNScore 2.0: A neural-network receptor-ligand scoring function. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 11, p. 2897–2903, 2011.

DWIVEDEE, B. P. et al. Lipase-catalyzed green synthesis of enantiopure atenolol. **RSC Advances**, v. 5, n. 21, p. 15850–15860, 2015.

DWIVEDEE, B. P. et al. Promiscuity of Lipase-Catalyzed Reactions for Organic Synthesis: A Recent Update. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 9, p. 2441–2466, 7 mar. 2018.

EDDYA, M.; TBIB, B.; EL-HAMI, K. A comparison of chitosan properties after extraction from shrimp shells by diluted and concentrated acids. **Heliyon**, v. 6, n. 2, p. e03486, fev. 2020.

EL KHALIDI, Z. et al. Nickel oxide optimization using Taguchi design for hydrogen detection. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 43, n. 27, p. 12574–12583, jul. 2018.

ELCHINGER, P.-H. et al. Immobilization of proteases on chitosan for the development of films with anti-biofilm properties. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1063–1068, jan. 2015.

ERICSSON, D. J. et al. X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation. **Journal of Molecular Biology**, v. 376, n. 1, p. 109–119, 2008.

---

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418, dez. 2009.

FERNANDEZ-LOPEZ, L. et al. Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 81–88, mar. 2017.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Improved catalytic properties of immobilized lipases by the presence of very low concentrations of detergents in the reaction medium. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 242–250, jun. 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061–1067, out. 2008.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 12, p. 9, 1 jan. 2017.

FERREIRA, I. M. et al. Immobilization of Amano lipase from *Pseudomonas fluorescens* on silk fibroin spheres: an alternative protocol for the enantioselective synthesis of halohydrins. **RSC Advances**, v. 7, n. 21, p. 12650–12658, 2017.

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

FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 102, n. 5, p. 1298–1315, 1 abr. 2009.

FONSECA, A. M. DA et al. Study of the Inhibition Potential of Remdesivir Derivatives on Mpro of SARS-COV-2. **International Journal of Research -GRANTHAALAYAH**, v. 8, n. 11, p. 164–174, dez. 2020a.

FONSECA, T. DE S. et al. Chemoenzymatic Synthesis of Luliconazole Mediated by Lipases. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 2018, n. 18, p. 2110–2116, 15 maio 2018.

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

FORNERA, S. et al. Sequential Immobilization of Enzymes in Microfluidic Channels for Cascade Reactions. **ChemPlusChem**, v. 77, n. 2, p. 98–101, fev. 2012.

---

FREIRE, T. M. et al. Magnetic Porous Controlled Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–Chitosan Nanostructure: An Ecofriendly Adsorbent for Efficient Removal of Azo Dyes. **Nanomaterials**, v. 10, n. 6, p. 1194, 19 jun. 2020.

FU, Y.; ZHAO, J.; CHEN, Z. Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. **Computational and Mathematical Methods in Medicine**, v. 2018, p. 1–12, dez. 2018.

GARCIA-GALAN, C. et al. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, nov. 2011.

GARCÍA-GARCÍA, P. et al. Co-Immobilization and Co-Localization of Oxidases and Catalases: Catalase from Bordetella Pertussis Fused with the Zbasic Domain. **Catalysts**, v. 10, n. 7, p. 810, 21 jul. 2020.

GHIACI, M. et al. Enzyme immobilization Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of Candida rugosa lipase. **Applied Clay Science**, v. 43, n. 3–4, p. 289–295, mar. 2009.

GODOY, C. A. et al. Glyoxyl-Disulfide Agarose: A Tailor-Made Support for Site-Directed Rigidification of Proteins. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 5, p. 1800–1809, 9 maio 2011.

GOMES, F. M.; PEREIRA, E. B.; DE CASTRO, H. F. Immobilization of Lipase on Chitin and Its Use in Nonconventional Biocatalysis. **Biomacromolecules**, v. 5, n. 1, p. 17–23, jan. 2004.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, n. 3–4, p. 111–120, jun. 2006.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 7–8, p. 797–812, maio 2006.

GREGORIO-JAUREGUI, K. M. et al. One-Step Method for Preparation of Magnetic Nanoparticles Coated with Chitosan. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1–8, 2012.

GUISAN, J. M. (ED.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. v. 22

GUNDA, N. S. K. et al. Optimization and characterization of biomolecule immobilization on silicon substrates using (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES) and glutaraldehyde linker. **Applied Surface Science**, v. 305, p. 522–530, jun. 2014.



---

GURUNG, N. et al. A Broader View: Microbial Enzymes and Their Relevance in Industries, Medicine, and Beyond. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–18, 2013.

GZYRA-JAGIEŁA, K. et al. Physicochemical Properties of Chitosan and its Degradation Products. In: **Chitin and Chitosan**. [s.l.] Wiley, 2019. p. 61–80.

HAHN, T. et al. Current state of chitin purification and chitosan production from insects. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 95, n. 11, p. 2775–2795, 25 nov. 2020.

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

HAMA, S.; NODA, H.; KONDO, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57–64, abr. 2018.

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

HAO, G. et al. Physicochemical characteristics of chitosan from swimming crab (*Portunus trituberculatus*) shells prepared by subcritical water pretreatment. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1646, 18 dez. 2021.

HARI KRISHNA, S.; PERSSON, M.; BORNSCHEUER, U. T. Enantioselective transesterification of a tertiary alcohol by lipase A from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 13, n. 24, p. 2693–2696, dez. 2002.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HASEGAWA, S.; AZUMA, M.; TAKAHASHI, K. Enzymatic esterification of lactic acid, utilizing the basicity of particular polar organic solvents to suppress the acidity of lactic acid. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 11, p. 1503–1510, out. 2008.

HAUER, B. Embracing Nature's Catalysts: A Viewpoint on the Future of Biocatalysis. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 15, p. 8418–8427, 7 ago. 2020.

HAVRANEK, B.; ISLAM, S. M. An in silico approach for identification of novel inhibitors as potential therapeutics targeting COVID-19 main protease. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, 2020.

HØEGH, I. et al. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in

- Aspergillus oryzae*. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. S1, p. 869–875, 31 dez. 1995.
- HUANG, S.-H.; LIAO, M.-H.; CHEN, D.-H. Direct Binding and Characterization of Lipase onto Magnetic Nanoparticles. **Biotechnology Progress**, v. 19, n. 3, p. 1095–1100, 6 jun. 2003.
- HUANG, S.; LIAO, M.; CHEN, D. Fast and efficient recovery of lipase by polyacrylic acid-coated magnetic nano-adsorbent with high activity retention. **Separation and Purification Technology**, v. 51, n. 2, p. 113–117, set. 2006.
- HWANG, E. T.; LEE, S. Multienzymatic Cascade Reactions via Enzyme Complex by Immobilization. **ACS Catalysis**, v. 9, n. 5, p. 4402–4425, 3 maio 2019.
- ILMI, M. et al. Process intensification of catalytic liquid-liquid solid processes: Continuous biodiesel production using an immobilized lipase in a centrifugal contactor separator. **Chemical Engineering Journal**, 2017.
- ISLAM, N.; DMOUR, I.; TAHA, M. O. Degradability of chitosan micro/nanoparticles for pulmonary drug delivery. **Heliyon**, v. 5, n. 5, p. e01684, maio 2019.
- JAEGER, K.-E.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 315–351, out. 1999.
- JAISWAL, N.; PANDEY, V. P.; DWIVEDI, U. N. Immobilization of papaya laccase in chitosan led to improved multipronged stability and dye discoloration. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 288–295, maio 2016.
- JANECZKO, T.; DYMARSKA, M.; KOSTRZEWA-SUSŁOW, E. Highly Enantioselective Production of (R)-Halohydrins with Whole Cells of *Rhodotorula rubra* KCh 82 Culture. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 22392–22404, 4 dez. 2014.
- JAVANBAKHT, T. et al. Relating the Surface Properties of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) to Their Bactericidal Effect towards a Biofilm of *Streptococcus mutans*. **PLOS ONE**, v. 11, n. 4, p. e0154445, abr. 2016.
- JEGANNATHAN, K. R. et al. Production of biodiesel from palm oil using liquid core lipase encapsulated in  $\kappa$ -carrageenan. **Fuel**, v. 89, n. 9, p. 2272–2277, set. 2010.
- JEMLI, S. et al. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 36, n. 2, p. 246–258, 3 mar. 2016.
- JIA, F.; NARASIMHAN, B.; MALLAPRAGADA, S. Materials-based strategies for multi-enzyme immobilization and co-localization: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 2, p. 209–222, fev. 2014.

---

JIMÉNEZ-GÓMEZ, C. P.; CECILIA, J. A. Chitosan: A Natural Biopolymer with a Wide and Varied Range of Applications. **Molecules**, v. 25, n. 17, p. 3981, 1 set. 2020.

KACZMAREK, M. B. et al. Enzymatic Modifications of Chitin, Chitosan, and Chitoooligosaccharides. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, 27 set. 2019.

KANG, W. et al. Cascade Biocatalysis by Multienzyme–Nanoparticle Assemblies. **Bioconjugate Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 1387–1394, 20 ago. 2014.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.

KARAMI, R. et al. A novel nanobiosensor for the detection of paraoxon using chitosan-embedded organophosphorus hydrolase immobilized on Au nanoparticles. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 46, n. 6, p. 559–566, 17 ago. 2016.

KARIMI, M.; MILANI, S. A.; ABOLGASHEMI, H. Kinetic and isotherm analyses for thorium (IV) adsorptive removal from aqueous solutions by modified magnetite nanoparticle using response surface methodology (RSM). **Journal of Nuclear Materials**, v. 479, p. 174–183, out. 2016.

KARIMI ZARCHI, M. A.; TARABSAZ, A. Versatile and efficient method for synthesis of  $\beta$ -halohydrins via regioselective ring opening reaction of epoxides using cross-linked poly (4-vinylpyridine) supported HCl and HBr under solvent-free conditions. **Journal of Polymer Research**, v. 20, n. 8, p. 208, 17 ago. 2013.

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

KASRAYAN, A. et al. Prediction of the *Candida antarctica* Lipase A Protein Structure by Comparative Modeling and Site-Directed Mutagenesis. **ChemBioChem**, v. 8, n. 12, p. 1409–1415, 13 ago. 2007.

KHADEMIAN, E. et al. A systematic review on carbohydrate biopolymers for adsorptive remediation of copper ions from aqueous environments-part A: Classification and modification strategies. **Science of The Total Environment**, v. 738, p. 139829, out. 2020.

KIM, K.-W. et al. Biocatalysis in Ionic Liquids: Markedly Enhanced Enantioselectivity of Lipase. **Organic Letters**, v. 3, n. 10, p. 1507–1509, maio 2001.

KIRK, O.; CHRISTENSEN, M. W. Lipases from *Candida antarctica* : Unique Biocatalysts from a Unique Origin. **Organic Process Research & Development**, v. 6, n. 4, p. 446–451, jul. 2002.

---

KOUACHI. POTENTIAL APPLICATIONS OF CHITOSAN NANOPARTICLES AS NOVEL SUPPORT IN ENZYME IMMOBILIZATION. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**, v. 8, n. 4, p. 203–219, 1 abr. 2012.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 2–3, p. 126–139, ago. 2004.

KUMAR, R. et al. Biocatalyst CAL-B catalyzed synthesis of modified nucleosides: An overview. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 13, p. 1659–1678, 3 jul. 2019a.

KUMAR, S. et al. Chitosan Nanocomposite Coatings for Food, Paints, and Water Treatment Applications. **Applied Sciences**, v. 9, n. 12, p. 2409, 13 jun. 2019b.

LARRAZA, I. et al. Hybrid materials: Magnetite-Polyethylenimine-Montmorillonite, as magnetic adsorbents for Cr(VI) water treatment. **J Colloid Interface Sci**, v. 385, n. 1, p. 24–33, 2012.

LERESCHE, J. E.; MEYER, H.-P. Chemocatalysis and Biocatalysis (Biotransformation): Some Thoughts of a Chemist and of a Biotechnologist. **Organic Process Research & Development**, v. 10, n. 3, p. 572–580, maio 2006.

LI, C. et al. Simultaneous measurement of refractive index, strain, and temperature based on a four-core fiber combined with a fiber Bragg grating. **Optics & Laser Technology**, v. 90, p. 179–184, maio 2017a.

LI, K. et al. Burkholderia cepacia lipase immobilized on heterofunctional magnetic nanoparticles and its application in biodiesel synthesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16473, 28 dez. 2017b.

LI, S. et al. Mechanistic insights into the inhibition of pancreatic lipase by apigenin: Inhibitory interaction, conformational change and molecular docking studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 335, p. 116505, ago. 2021a.

LI, X. et al. One-pot polyol synthesis of graphene decorated with size- and density-tunable Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. **Carbon**, v. 60, p. 488–497, ago. 2013.

LI, Y. et al. Characterization of a novel sn1,3 lipase from Ricinus communis L. suitable for production of oleic acid-palmitic acid-glycerol oleate. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6913, 25 dez. 2021b.

LIBURDI, K. et al. Lysozyme immobilized on chitosan beads: Kinetic characterization and antimicrobial activity in white wines. **Food Control**, v. 63, p. 46–52, maio 2016.

LIMA, G. V. et al. Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied**

**Catalysis A: General**, v. 546, n. May, p. 7–14, 2017.

LIMA, L. N. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase on hydrophobic supports and application in biodiesel synthesis by transesterification of vegetable oils in solvent-free systems. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 42, n. 4, p. 523–535, 28 abr. 2015.

LIMA, R. N. et al. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, p. 75–105, abr. 2019.

LIN, B.; TAO, Y. Whole-cell biocatalysts by design. **Microbial Cell Factories**, v. 16, n. 1, p. 106, 13 dez. 2017.

LISZKA, M. J. et al. Nature Versus Nurture: Developing Enzymes That Function Under Extreme Conditions. **Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering**, v. 3, n. 1, p. 77–102, 15 jul. 2012.

LIU, D.-M.; DONG, C. Recent advances in nano-carrier immobilized enzymes and their applications. **Process Biochemistry**, v. 92, p. 464–475, maio 2020.

LIU, H.; HOFF, B. H.; ANTHONSEN, T. Chemo-enzymatic synthesis of the antidepressant duloxetine and its enantiomer. **Chirality**, v. 12, n. 1, p. 26–29, 2000.

LIZARDI-MENDOZA, J.; ARGÜELLES MONAL, W. M.; GOYCOOLEA VALENCIA, F. M. Chemical Characteristics and Functional Properties of Chitosan. In: **Chitosan in the Preservation of Agricultural Commodities**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 3–31.

LÖFGREN, J. et al. Transesterification of a Tertiary Alcohol by Engineered *Candida antarctica* Lipase A. **ChemBioChem**, v. 20, n. 11, p. 1438–1443, 3 jun. 2019.

LOGANATHAN, P. et al. Progress, challenges, and opportunities in enhancing NOM flocculation using chemically modified chitosan: a review towards future development. **Environmental Science: Water Research & Technology**, v. 6, n. 1, p. 45–61, 2020.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F. *Rhizopus oryzae* Lipase, a Promising Industrial Enzyme: Biochemical Characteristics, Production and Biocatalytic Applications. **Catalysts**, v. 10, n. 11, p. 1277, 3 nov. 2020.

LU, C. et al. The Ru-catalyzed enantioselective preparation of chiral halohydrins and their application in the synthesis of (R)-clorprenaline and (S)-sotalol. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 22, n. 7, p. 722–727, abr. 2011.

LUND, I. T.; BÖCKMANN, P. L.; JACOBSEN, E. E. Highly enantioselective CALB-catalyzed kinetic resolution of building blocks for  $\beta$ -blocker atenolol. **Tetrahedron**, v.

---

72, n. 46, p. 7288–7292, nov. 2016.

LYU, J. et al. Covalent immobilization of *Bacillus subtilis* lipase A on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles by aldehyde tag: An ideal immobilization with minimal chemical modification. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 63–69, jun. 2019.

MA, H. F. et al. Chitosan crosslinked with genipin as supporting matrix for biodegradation of synthetic dyes: Laccase immobilization and characterization. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 132, p. 664–676, 2018.

MA, Z.; GUAN, Y.; LIU, H. Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 301, n. 2, p. 469–477, jun. 2006.

MACEIRAS, R. et al. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. **Fuel**, v. 88, n. 11, p. 2130–2134, nov. 2009.

MACHADO, N. B. et al. Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 128, p. 9–21, set. 2019.

MADRAS, G.; KOLLURU, C.; KUMAR, R. Synthesis of biodiesel in supercritical fluids. **Fuel**, v. 83, n. 14–15, p. 2029–2033, out. 2004.

MÄENPÄÄ, H.; KANERVA, L. T.; LILJEBLAD, A. Acylation of  $\beta$ -Amino Esters and Hydrolysis of  $\beta$ -Amido Esters: *Candida antarctica* Lipase A as a Chemoselective Deprotection Catalyst. **ChemCatChem**, v. 8, n. 6, p. 1226–1232, 18 mar. 2016.

MAHTO, T. K. et al. Polyaniline-functionalized magnetic mesoporous nanocomposite: A smart material for the immobilization of lipase. **Polymer Composites**, v. 37, n. 4, p. 1152–1160, abr. 2016.

MANOEL, E. A. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, abr. 2015.

MARÍN-SUÁREZ, M. et al. Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel. **Renewable Energy**, v. 140, p. 1–8, set. 2019.

MARTINELLE, M.; HOLMQUIST, M.; HULT, K. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1258, n. 3, p. 272–276, out. 1995.

MARTÍNEZ-LAGOS, F.; SINISTERRA, J. V. Enantioselective production of halohydrin

---

precursor of Propranolol catalysed by immobilized yeasts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 36, n. 1–6, p. 1–7, nov. 2005.

MATEO, C. et al. Some special features of glyoxyl supports to immobilize proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 4, p. 456–462, set. 2005.

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, maio 2007.

MATEO, C. et al. Improvement of Enzyme Properties with a Two-Step Immobilization Process on Novel Heterofunctional Supports. **Biomacromolecules**, v. 11, n. 11, p. 3112–3117, 8 nov. 2010.

MATHABA, M.; DARAMOLA, M. O. Effect of Chitosan's Degree of Deacetylation on the Performance of PES Membrane Infused with Chitosan during AMD Treatment. **Membranes**, v. 10, n. 3, p. 52, 24 mar. 2020.

MAZURENKO, S.; PROKOP, Z.; DAMBORSKY, J. Machine Learning in Enzyme Engineering. **ACS Catalysis**, v. 10, n. 2, p. 1210–1223, 17 jan. 2020.

MEI, Y.; KUMAR, A.; GROSS, R. A. Probing Water-Temperature Relationships for Lipase-Catalyzed Lactone Ring-Opening Polymerizations. **Macromolecules**, v. 35, n. 14, p. 5444–5448, 1 jul. 2002.

MELANI, N. B.; TAMBOURGI, E. B.; SILVEIRA, E. Lipases: From Production to Applications. **Separation & Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, 2 abr. 2020.

MELO, A. et al. Synthesis of Benzyl Acetate Catalyzed by Lipase Immobilized in Nontoxic Chitosan-Polyphosphate Beads. **Molecules**, v. 22, n. 12, p. 2165, 7 dez. 2017.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MENDES, A. A. et al. Immobilization and stabilization of microbial lipases by multipoint covalent attachment on aldehyde-resin affinity: Application of the biocatalysts in biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 1, p. 109–115, jan. 2011a.

MENDES, A. A. et al. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055–1066, 5 ago. 2011b.

MERYAM SARDAR, R. A. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as

---

Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 04, n. 02, p. 1000178, 2015.

MERZENDORFER, H.; COHEN, E. Chitin/Chitosan: Versatile Ecological, Industrial, and Biomedical Applications. In: [s.l: s.n.]. p. 541–624.

MINAMI, E.; SAKA, S. Kinetics of hydrolysis and methyl esterification for biodiesel production in two-step supercritical methanol process. **Fuel**, v. 85, n. 17–18, p. 2479–2483, dez. 2006.

MITTELBAACH, M. Fuels from oils and fats: Recent developments and perspectives. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 11, p. 1832–1846, nov. 2015.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 4 mar. 2015.

MOHAMMADI, M. et al. Improvement of the stability and selectivity of *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on silica nanoparticles: Selective hydrolysis of fish oil using immobilized preparations. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1314–1323, ago. 2014.

MOHAMMADI, M. et al. Rapid and high-density covalent immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase using a multi component reaction: application in biodiesel production. **RSC Advances**, v. 5, n. 41, p. 32698–32705, 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, n. December 2019, p. 109506, 2020.

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, 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 ago. 2019b.

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

MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida*



---

antarctica. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141–154, fev. 2021b.

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

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 abr. 2020b.

MORELLON-STERLING, R. et al. Effect of amine length in the interference of the multipoint covalent immobilization of enzymes on glyoxyl agarose beads. **Journal of Biotechnology**, v. 329, p. 128–142, mar. 2021.

MORIN-CRINI, N. et al. Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. **Environmental Chemistry Letters**, v. 17, n. 4, p. 1667–1692, 13 dez. 2019.

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

MOUAD, A. M. et al. Aminolysis of linoleic and salicylic acid derivatives with *Candida antarctica* lipase B: A solvent-free process to obtain amphiphilic amides for cosmetic application. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 126, p. 64–68, abr. 2016.

MU, X. et al. Poly(2-Vinyl-4,4-dimethylazlactone)-Functionalized Magnetic Nanoparticles as Carriers for Enzyme Immobilization and Its Application. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 23, p. 21346–21354, dez. 2014.

MUANRUKSA, P.; KAEWKANNETRA, P. Combination of fatty acids extraction and enzymatic esterification for biodiesel production using sludge palm oil as a low-cost substrate. **Renewable Energy**, v. 146, p. 901–906, fev. 2020.

MULINARI, J. et al. Ultrasound-assisted hydrolysis of waste cooking oil catalyzed by homemade lipases. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 313–318, mar. 2017.

MÜLLER, J. et al. A high-throughput assay for the determination of acyltransferase activity of lipase CAL-A. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 116, n. 2, p. 232–236, fev. 2014.

MÜLLER, J. et al. Enhancing the Acyltransferase Activity of *Candida antarctica* Lipase A by Rational Design. **ChemBioChem**, v. 16, n. 12, p. 1791–1796, 17 ago. 2015a.

MÜLLER, J. et al. The acyltransferase activity of lipase CAL-A allows efficient fatty acid esters formation from plant oil even in an aqueous environment. **European Journal**

---

of **Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 12, p. 1903–1907, dez. 2015b.

MURALI, G.; FEDIUK, R. A Taguchi approach for study on impact response of ultra-high-performance polypropylene fibrous cementitious composite. **Journal of Building Engineering**, v. 30, p. 101301, jul. 2020.

MUSA, M. M.; HOLLMANN, F.; MUTTI, F. G. Synthesis of enantiomerically pure alcohols and amines via biocatalytic deracemisation methods. **Catalysis Science & Technology**, v. 9, n. 20, p. 5487–5503, 2019.

NAGAOKA, K.; YAMADA, Y. Purification of Mucor Lipases and Their Properties. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 37, n. 12, p. 2791–2796, 9 dez. 1973.

NAWAL, G. et al. An Overview of Bacterial Lipases and their Enormous Applications. **Punjab University Journal of Zoology**, jun. 2019.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85–86, p. 71–92, jan. 2013.

NGAOSUWAN, K. et al. Hydrolysis of Triglycerides Using Solid Acid Catalysts. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 10, p. 4757–4767, 20 maio 2009.

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.

NIELSEN, T. B.; ISHII, M.; KIRK, O. Lipases A and B from the yeast *Candida antarctica*. In: **Biotechnological Applications of Cold-Adapted Organisms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1999. p. 49–61.

NISAR, J. et al. Enhanced biodiesel production from *Jatropha* oil using calcined waste animal bones as catalyst. **Renewable Energy**, v. 101, p. 111–119, fev. 2017.

NOEL, M.; COMBES, D. Effects of temperature and pressure on *Rhizomucor miehei* lipase stability. **Journal of Biotechnology**, v. 102, n. 1, p. 23–32, abr. 2003.

NOËL, M.; LOZANO, P.; COMBES, D. Polyhydric alcohol protective effect on

---

Rhizomucor miehei lipase deactivation enhanced by pressure and temperature treatment.

**Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, n. 6, p. 375–380, 26 out. 2005.

NORIN, M. et al. Computer modeling of substrate binding to lipases from Rhizomucor miehei, Humicola lanuginosa, and Candida rugosa. **Protein Science**, v. 3, n. 9, p. 1493–1503, set. 1994.

NOVAES, J. et al. Preparation and characterization of Chitosan/Collagen blends containing silver nanoparticles. **Polímeros**, v. 30, n. 2, 2020.

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

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

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An Open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 10, p. 1–14, 2011.

O'REILLY, A. M.; SCOTT, J. A. Defined coimmobilization of mixed microorganism cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, n. 7, p. 636–646, jul. 1995.

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

OLLIS, D. L. et al. The  $\alpha / \beta$  hydrolase fold. “**Protein Engineering, Design and Selection**”, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

ONDUL, E.; DIZGE, N.; ALBAYRAK, N. Immobilization of Candida antarctica A and Thermomyces lanuginosus lipases on cotton terry cloth fibrils using polyethyleneimine. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 109–114, 2012.

ORLANDO BEYS SILVA, W. et al. Production and extraction of an extracellular lipase from the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 321–326, jan. 2005.

---

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

OU, A. et al. The Chemistry of Chitin and Chitosan Justifying their Nanomedical Utilities. **Biochemistry & Pharmacology: Open Access**, v. 07, n. 01, 2018.

ÖZDEMIRHAN, D. Optically active tertiary alcohols by biocatalysis. **Synthetic Communications**, v. 47, n. 7, p. 629–645, 3 abr. 2017.

ÖZDEMIRHAN, D.; SEZER, S.; SÖNMEZ, Y. Enzyme-catalyzed resolution of aromatic ring fused cyclic tertiary alcohols. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 19, n. 23, p. 2717–2720, dez. 2008.

PALOMO, J. M. et al. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n. 1, p. 1–6, 2003.

PALOMO, J. M. et al. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447–454, mar. 2005.

PALOMO, J. M. et al. Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 2, p. 630–635, set. 2008.

PANDEY, R. K.; UPADHYAY, R. K.; KUMAR, P. An asymmetric dihydroxylation route towards the synthesis of (R)-clorprenaline hydrochloride. **Arkivoc**, v. 2006, n. 14, p. 10–14, 11 set. 2006.

PATEL, N. et al. Lipases: Sources, Production, Purification, and Applications. **Recent Patents on Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 45–56, 1 fev. 2019.

PAWLAK, A.; MUCHA, M. Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends. **Thermochimica Acta**, v. 396, n. 1–2, p. 153–166, fev. 2003.

PETROVA, S. S.; SOLOV'EV, A. D. The Origin of the Method of Steepest Descent. **Historia Mathematica**, v. 24, n. 4, p. 361–375, 1997.

---

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

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

PINTO, R. M. A.; SALVADOR, J. A. R.; LE ROUX, C. Bismuth(III) salts mediated regioselective ring opening of epoxides: an easy route to halohydrins and  $\beta$ -hydroxy nitrates. **Tetrahedron**, v. 63, n. 37, p. 9221–9228, set. 2007.

PONVEL, K. M. et al. Immobilization of lipase on surface modified magnetic nanoparticles using alkyl benzenesulfonate. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 1, p. 127–130, 28 jan. 2009.

POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, ago. 2016.

PRAKASH, D. et al. Actinomycetes: A Repertory of Green Catalysts with a Potential Revenue Resource. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

QUIÑONES, J. P.; PENICHE, H.; PENICHE, C. Chitosan Based Self-Assembled Nanoparticles in Drug Delivery. **Polymers**, v. 10, n. 3, p. 235, 26 fev. 2018.

RABBANI, G. et al. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. **RSC Advances**, v. 5, n. 26, p. 20115–20131, 2015.

RAFIEE, F.; REZAEI, M. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 170–195, maio 2021.

RAHMAN, I. N. A. et al. Statistical optimization and operational stability of *Rhizomucor miehei* lipase supported on magnetic chitosan/chitin nanoparticles for synthesis of pentyl valerate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 680–695, ago.

2018.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207–219, fev. 2009.

RAKSHIT, S.; HALDER, S. K.; MONDAL, K. C. Appraisal of Chitosan-Based Nanomaterials in Enzyme Immobilization and Probiotics Encapsulation. In: [s.l: s.n.]. p. 163–188.

RASOULZADEH, H. et al. Mechanistic investigation of ciprofloxacin recovery by magnetite-imprinted chitosan nanocomposite: Isotherm, kinetic, thermodynamic and reusability studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 133, p. 712–721, jul. 2019.

RAVELO, M. et al. Esterification of glycerol and ibuprofen in solventless media catalyzed by free CALB: Kinetic modelling. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 228–236, set. 2015.

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

REN, Y.; LEE, B.; PADOVAN, B. Penetration of methyl bromide, sulfuryl fluoride, ethanedinitrile and phosphine into timber blocks and the sorption rate of the fumigants. **Journal of Stored Products Research**, v. 47, n. 2, p. 63–68, abr. 2011.

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

RICARDI, N. C. et al. Highly stable novel silica/chitosan support for  $\beta$ -galactosidase immobilization for application in dairy technology. **Food Chemistry**, v. 246, p. 343–350, abr. 2018.

RIMAC, H.; GRISHINA, M.; POTEKIN, V. Use of the Complementarity Principle in Docking Procedures: A New Approach for Evaluating the Correctness of Binding Poses. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 61, n. 4, p. 1801–1813, 26 abr. 2021.

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, nov. 2016.

RIOS, N. S. et al. Increasing the Enzyme Loading Capacity of Porous Supports by a Layer-by-Layer Immobilization Strategy Using PEI as Glue. **Catalysts**, v. 9, n. 7, p. 576, 29 jun. 2019.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 15 nov. 2015.

ROCA, A. G. et al. Effect of nature and particle size on properties of uniform magnetite and maghemite nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 50, p. 18577–18584, dez. 2007.

RODRIGUES, D. S. et al. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 51, n. 3–4, p. 100–109, abr. 2008.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

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, set. 2019.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling Chemical Modification and Immobilization to Improve the Catalytic Performance of Enzymes. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 353, n. 13, p. 2216–2238, set. 2011.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1–2, p. 1–22, jun. 2010a.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B:**

---

**Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, set. 2010b.

ROSSI, L. M. et al. Magnetic nanomaterials in catalysis: advanced catalysts for magnetic separation and beyond. **Green Chemistry**, v. 16, n. 6, p. 2906, 2014.

ROUHANI SHIRVAN, A.; SHAKERI, M.; BASHARI, A. Recent advances in application of chitosan and its derivatives in functional finishing of textiles. In: **The Impact and Prospects of Green Chemistry for Textile Technology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 107–133.

RUEDA, N. et al. Reactivation of lipases by the unfolding and refolding of covalently immobilized biocatalysts. **RSC Advances**, v. 5, n. 68, p. 55588–55594, 2015.

RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipases improves their immobilization on octyl-glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v. 259, p. 107–118, jan. 2016.

SADIGHI, A.; FARAMARZI, M. A. Congo red decolorization by immobilized laccase through chitosan nanoparticles on the glass beads. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, n. 2, p. 156–162, mar. 2013.

SAHOO, B.; DUTTA, S.; DHARA, D. Amine-functionalized magnetic nanoparticles as robust support for immobilization of Lipase. **Journal of Chemical Sciences**, v. 128, n. 7, p. 1131–1140, 16 jul. 2016.

SAMUELS, R. J. Solid state characterization of the structure of chitosan films. **Journal of Polymer Science: Polymer Physics Edition**, v. 19, n. 7, p. 1081–1105, jul. 1981.

SANDSTROM, A. G. et al. Combinatorial reshaping of the *Candida antarctica* lipase A substrate pocket for enantioselectivity using an extremely condensed library. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 1, p. 78–83, 3 jan. 2012.

SANDSTRÖM, A. G. et al. Directed evolution of *Candida antarctica* lipase A using an episomally replicating yeast plasmid. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 22, n. 7, p. 413–420, 2009.

SANKARAN, R.; SHOW, P. L.; CHANG, J.-S. Biodiesel production using immobilized lipase: feasibility and challenges. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 10, n. 6, p. 896–916, nov. 2016.



---

SANTI, M. et al. Flow Biocatalysis: A Challenging Alternative for the Synthesis of APIs and Natural Compounds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, p. 990, 20 jan. 2021.

SANTOS, J. C. S. DOS et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. **ChemCatChem**, v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 17 ago. 2015.

SANTOS, V. P. et al. Seafood Waste as Attractive Source of Chitin and Chitosan Production and Their Applications. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 12, p. 4290, 16 jun. 2020.

SATAR, R. et al. Role of Glutaraldehyde in Imparting Stability to Immobilized  $\beta$ -Galactosidase Systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, 8 jan. 2018.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1608–1633, 3 jul. 1998.

SCHOFFELEN, S.; VAN HEST, J. C. Chemical approaches for the construction of multi-enzyme reaction systems. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 23, n. 4, p. 613–621, ago. 2013.

SEKOAI, P. T. et al. Application of nanoparticles in biofuels: An overview. **Fuel**, v. 237, p. 380–397, fev. 2019.

SHAFIEE, S.; AHANGAR, H. A.; SAFFAR, A. Taguchi method optimization for synthesis of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@chitosan/Tragacanth Gum nanocomposite as a drug delivery system. **Carbohydrate Polymers**, v. 222, p. 114982, out. 2019.

SHAH, S. H. Sustainable Biodiesel Production. In: **Reference Module in Materials Science and Materials Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2019.

SHAHEDI, M. et al. Co-immobilization of Rhizomucor miehei lipase and Candida antarctica lipase B and optimization of biocatalytic biodiesel production from palm oil using response surface methodology. **Renewable Energy**, v. 141, p. 847–857, out. 2019.

SHAO, Y.-B. et al. Characterization and optimization of mesoporous magnetic

---

nanoparticles for immobilization and enhanced performance of porcine pancreatic lipase.

**Chemical Papers**, v. 69, n. 10, 1 jan. 2015.

SHARIFI DEHSARI, H. 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, dez. 2018.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, n. 8, p. 627–662, dez. 2001.

SHELDON, R. A.; BASSO, A.; BRADY, D. New frontiers in enzyme immobilisation: robust biocatalysts for a circular bio-based economy. **Chemical Society Reviews**, v. 50, n. 10, p. 5850–5862, 2021.

SHELDON, R. A.; PEREIRA, P. C. Biocatalysis engineering: the big picture. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 10, p. 2678–2691, 2017.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 27 mar. 2013.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 24 jan. 2018.

SHIEH, C.-J.; LIAO, H.-F.; LEE, C.-C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 88, n. 2, p. 103–106, jun. 2003.

SILVA, C.; CAVACO-PAULO, A. M.; FU, J. J. Enzymatic biofinishes for synthetic textiles. In: **Functional Finishes for Textiles**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 153–191.

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

SINGH, R. et al. From Protein Engineering to Immobilization: Promising Strategies for the Upgrade of Industrial Enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 1, p. 1232–1277, 10 jan. 2013.

---

SIVA DEEPTHI, S. et al. A Green Approach towards the Synthesis of Enantio Pure Diols Using Horse Radish Peroxidase Enzyme Immobilized on Magnetic Nanoparticles. **Green and Sustainable Chemistry**, v. 04, n. 01, p. 15–19, 2014.

STEPANKOVA, V. et al. Strategies for Stabilization of Enzymes in Organic Solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823–2836, 6 dez. 2013.

STRZELCZYK, P. et al. Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from *Candida antarctica*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 1, 30 dez. 2015.

SUO, H. et al. Synthesis of functional ionic liquid modified magnetic chitosan nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. **Materials Science and Engineering: C**, v. 96, p. 356–364, mar. 2019.

SURENDRA, K. et al. Regioselective Ring Opening of Oxiranes to Halohydrins with Tetrabutylammonium Halide in Water in the Presence of  $\beta$ -Cyclodextrin. **Letters in Organic Chemistry**, v. 2, n. 7, p. 652–658, 1 nov. 2005.

SUTHERLAND, J. J. et al. Lessons in molecular recognition. 2. Assessing and improving cross-docking accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 47, n. 6, p. 2293–2302, nov. 2007.

SUTTON, R. S.; MAHMOOD, A. R.; WHITE, M. An emphatic approach to the problem of off-policy temporal-difference learning. **Journal of Machine Learning Research**, v. 17, p. 1–29, 2016.

SZCZĘSNA ANTCZAK, M. et al. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185–1194, maio 2009.

TAMER, T.; OMER, A.; HASSAN, M. Methods of Enzyme Immobilization. **International Journal of Current Pharmaceutical Review and Research**, v. 7, n. December, p. 385–392, 2016.

TAPDIGOV, S. Z. The bonding nature of the chemical interaction between trypsin and chitosan based carriers in immobilization process depend on entrapped method: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1676–1696, jul. 2021.

TEODORO, C. et al. Immobilization of Biotechnologically Important *Candida rugosa* Lipase onto Commercial Matrices. n. 8, p. 1–6, 2019.

THANGARAJ, B. et al. Effect of silica coating on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for

---

lipase immobilization and their application for biodiesel production. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 8, p. 4694–4706, dez. 2019.

TIAN, F. et al. Rational surface silane modification for immobilizing glucose oxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 191–194, jun. 2016.

TIAN, X. et al. A novel process of lipase-mediated biodiesel production by the introduction of dimethyl carbonate. **Catalysis Communications**, v. 101, p. 89–92, nov. 2017.

TREICHEL, H. et al. A Review on Microbial Lipases Production. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 2, p. 182–196, 25 abr. 2010.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TSAIH, M. L.; CHEN, R. H. The effect of reaction time and temperature during heterogenous alkali deacetylation on degree of deacetylation and molecular weight of resulting chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 88, n. 13, p. 2917–2923, 24 jun. 2003.

TUBINO, M.; JUNIOR, J. G. R.; BAUERFELDT, G. F. Biodiesel synthesis: A study of the triglyceride methanolysis reaction with alkaline catalysts. **Catalysis Communications**, v. 75, p. 6–12, fev. 2016.

TZIALLA, A. A. et al. Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of  $\alpha$ -pinene. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1587–1594, mar. 2010.

UPPENBERG, J. et al. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293–308, abr. 1994.

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, mar. 2018.

VAN TILBEURGH, H. et al. Interfacial activation of the lipase–procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography. **Nature**, v. 362, n. 6423, p. 814–820, abr. 1993.

VARMA, R.; VASUDEVAN, S. Extraction, Characterization, and Antimicrobial

---

Activity of Chitosan from Horse Mussel *Modiolus modiolus*. **ACS Omega**, v. 5, n. 32, p. 20224–20230, 18 ago. 2020.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. et al. Effect of chemical modification of Novozym 435 on its performance in the alcoholysis of camelina oil. **Biochemical Engineering Journal**, v. 111, p. 75–86, 2016.

VERMA, M. L. et al. Chitin and chitosan-based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 2, p. 315–323, 22 mar. 2020.

WAHAJUDDIN; ARORA. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3445, jul. 2012.

WAHL, J. et al. Accuracy evaluation and addition of improved dihedral parameters for the MMFF94s. **Journal of Cheminformatics**, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2019.

WANG, G. et al. Synthesis, characterization and magnetorheological study of 3-aminopropyltriethoxysilane-modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Smart Materials and Structures**, v. 25, n. 3, p. 035028, fev. 2016.

WANG, J. et al. Immobilization of Lipases on Alkyl Silane Modified Magnetic Nanoparticles: Effect of Alkyl Chain Length on Enzyme Activity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43478, 30 ago. 2012.

WANG, K. et al. Construction and characterization of a nanostructured biocatalyst consisting of immobilized lipase on aminopropyl-functionalized montmorillonite. **Applied Clay Science**, v. 183, p. 105329, dez. 2019.

WU, H. et al. Enzymatic conversion of waste oil to biodiesel in a solvent-free system. **ACS Division of Fuel Chemistry, Preprints**, v. 48, n. 2, p. 533–534, 2003.

WU, X. Y.; JÄÄSKELÄINEN, S.; LINKO, W.-Y. Purification and partial characterization of *Rhizomucor miehei* lipase for ester synthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 59, n. 2, p. 145–158, maio 1996.

XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalys for biodiesel

---

production. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 17, p. 1353–1374, 2009a.

XIE, W.; MA, N. Immobilized Lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles as Biocatalyst for Biodiesel Production. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 3, p. 1347–1353, mar. 2009b.

XIE, W.; ZANG, X. Covalent immobilization of lipase onto aminopropyl-functionalized hydroxyapatite-encapsulated- $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: A magnetic biocatalyst for interesterification of soybean oil. **Food Chemistry**, v. 227, p. 397–403, jul. 2017.

XU, K. et al. Immobilization of Multi-Enzymes on Support Materials for Efficient Biocatalysis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, 30 jun. 2020.

XU, Z.; LIU, Q.; FINCH, J. A. Silanation and stability of 3-aminopropyl triethoxy silane on nanosized superparamagnetic particles: I. Direct silanation. **Applied Surface Science**, v. 120, n. 3–4, p. 269–278, dez. 1997.

YADAV, J. S. et al. Green Protocol for the Synthesis of vicinal -Halohydrins from Oxiranes Using the [Bmim]PF<sub>6</sub>/LiX Reagent System. **Chemistry Letters**, v. 33, n. 4, p. 476–477, abr. 2004.

YAN, J.; YAN, Y. Biodiesel Production and Technologies. In: **Encyclopedia of Sustainable Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 261–272.

YEUL, V. S.; RAYALU, S. S. Unprecedented Chitin and Chitosan: A Chemical Overview. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 21, n. 2, p. 606–614, 14 jun. 2013.

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

YU, D. et al. Immobilized CALB Catalyzed Transesterification of Soybean Oil and Phytosterol. **Food Biophysics**, v. 13, n. 2, p. 208–215, 10 jun. 2018.

YU, X. et al. Co-immobilization of multi-enzyme on reversibly soluble polymers in cascade catalysis for the one-pot conversion of gluconic acid from corn straw. **Bioresource Technology**, v. 321, p. 124509, fev. 2021.

---

ZAINOL ABIDIN, N. A. et al. The Potential of Insects as Alternative Sources of Chitin: An Overview on the Chemical Method of Extraction from Various Sources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 4978, 15 jul. 2020.

ZAITSEV, S. Y.; SAVINA, A. A.; ZAITSEV, I. S. Biochemical aspects of lipase immobilization at polysaccharides for biotechnology. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 272, p. 102016, out. 2019.

ZAMOST, B. L.; NIELSEN, H. K.; STARNES, R. L. Thermostable enzymes for industrial applications. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 71–81, set. 1991.

ZDARTA, J. et al. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 24 fev. 2018.

ZECHNER, R. et al. FAT SIGNALS - Lipases and Lipolysis in Lipid Metabolism and Signaling. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 279–291, mar. 2012.

ZENG, S. et al. Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase. **ACS Catalysis**, v. 8, n. 9, p. 8856–8865, 7 set. 2018.

ZHANG, C. et al. Novel Chitosan-Derived Nanomaterials and Their Micelle-Forming Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 22, p. 8409–8416, 1 nov. 2006.

ZHANG, D.-H.; YUWEN, L.-X.; PENG, L.-J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. **Journal of Chemistry**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

ZHANG, H. et al. Lipases immobilized on the modified polyporous magnetic cellulose support as an efficient and recyclable catalyst for biodiesel production from Yellow horn seed oil. **Renewable Energy**, v. 145, p. 1246–1254, jan. 2020.

ZHANG, H.; LIU, R.; ZHENG, J. Selective determination of cholesterol based on cholesterol oxidase-alkaline phosphatase bienzyme electrode. **The Analyst**, v. 137, n. 22, p. 5363, 2012.

ZHANG, J. et al. Highly regio- and diastereoselective halohydroxylation of olefins: a facile synthesis of vicinal halohydrins. **Tetrahedron**, v. 67, n. 36, p. 6859–6867, set. 2011.

ZHANG, Q. et al. Performance prediction and evaluation of the scroll-type hydrogen pump for FCVs based on CFD–Taguchi method. **International Journal of Hydrogen Energy**, n. xxxx, 2019.

ZHANG, X. et al. Chitin Synthesis and Degradation in Crustaceans: A Genomic View

---

and Application. **Marine Drugs**, v. 19, n. 3, p. 153, 15 mar. 2021.

ZHANG, Y.-H. P. Simpler Is Better: High-Yield and Potential Low-Cost Biofuels Production through Cell-Free Synthetic Pathway Biotransformation (SyPaB). **ACS Catalysis**, v. 1, n. 9, p. 998–1009, 2 set. 2011.

ZHONG, L. et al. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207–222, jun. 2020.