



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro de Tecnologia e Ciências

Instituto de Química

Sabrina Santos Teixeira

Desenvolvimento de biocatalisadores à base de lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético para aplicação em reações de esterificação

Rio de Janeiro

2025

Sabrina Santos Teixeira

Desenvolvimento de biocatalisadores à base de lipase B de *Candida antarctica* immobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético para aplicação em reações de esterificação



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Linha de pesquisa: Química e Tecnologia de Materiais.

Orientador: Prof.^a Dra. Luciana da Cunha Costa

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Antonio da Silva Costa

Coorientadora: Prof.^a Dra. Eliane Pereira Cicolatti

Rio de Janeiro

2025

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC/Q

T266 Teixeira, Sabrina Santos.

Desenvolvimento de biocatalisadores à base de lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético para aplicação em reações de esterificação. – 2025.

139 f.

Orientador (a): Luciana da Cunha Costa
Marcos Antonio da Silva Costa
Eliane Pereira Cipolatti

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro.
Instituto de Química.

1. Polímeros – Teses. 2. Lipase – Teses. 3. Catalisadores – Teses. I. Costa, Luciana da Cunha. II. Costa, Marcos Antonio da Silva. III. Cipolatti, Eliane Pereira. IV. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Química. V. Título.

CDU 541.6

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

09/04/2025

Assinatura

Data

Sabrina Santos Teixeira

Desenvolvimento de biocatalisadores à base de lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético para aplicação em reações de esterificação

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Linha de pesquisa: Química e Tecnologia de Materiais.

Aprovado em 19 de fevereiro de 2025.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Luciana da Cunha Costa (Orientadora)
Faculdade de Ciências Biológicas e Saúde – UERJ

Prof. Dr. Marcos Antonio da Silva Costa (Coorientador)
Instituto de Química – UERJ

Prof.^a Dra. Eliane Pereira Cipolatti (Coorientadora)
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Marcela Cristina de Moraes
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Luciana Spinelli Ferreira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2025

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosana e Mauro, fonte inspiradora de todo meu amor pelo conhecimento.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por meio do Espírito Santo concedeu-me a paz que excede todo entendimento para ultrapassar os muitos obstáculos que surgiram ao longo do desenvolvimento deste trabalho.

A minha família, que foi compreensiva e amorosa, respeitando o tempo que eu precisava dedicar a esta Dissertação. Em especial, a minha mãezinha, Rosana dos Santos, a maior incentivadora dos meus sonhos.

Aos amigos que os longos dias de laboratório me concederam, Henrique Cunha, João Lourenço, Lisandra Paulino, Isabelle Feitosa, Tatyane Araujo, João Victor e Joice Carvalho. Gratidão pelo apoio, amizade e cooperação nesta jornada.

A uma amiga muito querida, Ezaine Torquato, que não mediu esforços para contribuir com esta Dissertação. Gratidão pelo suporte desde a graduação, minha eterna orientadora.

Ao amigo, Luís Augusto, cuja colaboração foi fundamental para a finalização dos experimentos desta Dissertação. Gratidão pela parceria e que possa ser a primeira de muitas.

Ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro, em especial à Dimci/Diele/Lamat, pelo inestimável apoio na realização dos ensaios de propriedades magnéticas de materiais, cuja colaboração foi fundamental para o sucesso desta Dissertação.

Aos meus orientadores, Luciana Cunha, Eliane Cipolatti e Marcos Costa, que como faróis me guiaram diligentemente pelas áreas do conhecimento que este trabalho exigiu.

Ao PPGQ da UERJ e a todo corpo docente, que me proporcionaram o suporte necessário para a concretização deste sonho.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

TEIXEIRA, S. S. **Desenvolvimento de biocatalisadores à base de lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético para aplicação em reações de esterificação.** 2025. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Os biocatalisadores magnéticos combinam propriedades magnéticas à atividade catalítica das enzimas o que viabiliza o desenvolvimento de biocatalisadores com fácil recuperação e reutilização em reações de esterificação de relevância industrial. Nesta Dissertação, copolímeros de poli(estireno-co-divinilbenzeno) contendo magnetita foram sintetizados por polimerização em semissuspensão aquosa. Estes copolímeros foram empregados como suportes para a imobilização de lipase B de *Candida antarctica* (CALB). Diferentes diluições em *n*-heptano (S1 = 50 %, S2 = 100 % e S3 = 150 %) foram empregados na síntese destas partículas, a fim de variar a estrutura do suporte magnético e estudar a relação da morfologia dos suportes com os parâmetros de imobilização e o desempenho dos biocatalisadores. Os suportes magnéticos obtidos foram caracterizados por microscopia ótica, FTIR, TG-DTG, SEM-EDS, XRD, ASAP e VSM. O suporte preparado com 100% de diluição em *n*-heptano (S2) foi o único obtido com morfologia esférica e integridade das partículas. A cinética de imobilização foi acompanhada por meio da atividade hidrolítica (U/mL) e da concentração de proteínas (mg/g_{suporte}) no sobrenadante. Não foi possível observar variação do rendimento de imobilização dos biocatalisadores em função da variação do grau de diluição. Os biocatalisadores magnéticos obtidos (BioS1, BioS2 e BioS3) apresentaram conversões de oleato de etila 30,5±6,0; 63,0±10,8 e 66,0±5,2 %, respectivamente. Estudos de avaliação da influência da temperatura e da influência do tamanho de cadeia carbônica dos ácidos graxos na esterificação foram conduzidos com o biocatalisador BioS2, obtido a partir do suporte S2, com melhor integridade estrutural. BioS2 apresentou percentuais de conversão do oleato de etila maiores em todas as temperaturas avaliadas (30, 40, 50 e 60 °C), em comparação a CALB livre, sugerindo que o suporte conferiu maior estabilidade térmica às enzimas. O biocatalisador BioS2 apresentou maiores conversões que a CALB livre nas reações de esterificação dos ácidos palmítico, esteárico e oleico. Porém, o percentual de conversão em éster na reação de esterificação do ácido cáprico foi maior para a CALB livre. Estes resultados sugerem que a imobilização favoreceu a conversão em éster de ácidos graxos com maiores tamanhos de cadeia, em comparação a CALB livre. Foram conduzidos 5 ciclos de uso do biocatalisador magnético BioS2, que manteve 50% do percentual de conversão de oleato de etila inicial. Pode-se afirmar que um novo biocatalisador magnético foi obtido à base de CALB imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético e demonstrou ser adequado para reações de esterificação de ésteres etílicos a partir de ácidos graxos alifáticos com diferentes tamanhos de cadeia carbônica.

Palavras-chave: biocatalisador magnético; polímero magnético; lipase imobilizada; esterificação.

ABSTRACT

Teixeira, S. S. **Development of biocatalysts based on lipase B from *Candida antarctica* immobilized in magnetic poly(styrene-co-divinylbenzene) for application in esterification reactions.** 2025. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Magnetic biocatalysts combine magnetic properties with the catalytic activity of enzymes, which enables the development of biocatalysts that are easy to recover and reuse in esterification reactions of industrial relevance. In this Dissertation, poly(styrene-co-divinylbenzene) copolymers containing magnetite were synthesized by polymerization in aqueous semisuspension. These copolymers were used as supports for the immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB). Different dilutions in *n*-heptane (S1 = 50%, S2 = 100% and S3 = 150%) were used in the synthesis of these particles, in order to vary the structure of the magnetic support and to study the relationship between the morphology of the supports and the immobilization parameters and the performance of the biocatalysts. The obtained magnetic supports were characterized by optical microscopy, FTIR, TG-DTG, SEM-EDS, XRD, ASAP and VSM. The support prepared with 100% dilution in *n*-heptane (S2) was the only one obtained with spherical morphology and particle integrity. The immobilization kinetics were monitored by means of the hydrolytic activity (U/mL) and the protein concentration (mg/g_{support}) in the supernatant. It was not possible to observe any variation in the immobilization yield of the biocatalysts as a function of the variation in the degree of dilution. The magnetic biocatalysts obtained (BioS1, BioS2 and BioS3) presented ethyl oleate conversions of 30,5±6,0; 63,0±10,8 and 66,0±5,2%, respectively. Studies evaluating the influence of temperature and the influence of the carbon chain size of fatty acids on esterification were conducted with the BioS2 biocatalyst, obtained from the S2 support, with better structural integrity. BioS2 presented higher ethyl oleate conversion percentages at all temperatures evaluated (30, 40, 50 and 60 °C), compared to free CALB, showing that the support conferred greater thermal stability to the enzymes. The biocatalyst BioS2 showed higher conversions than free CALB in the esterification reactions of palmitic, stearic and oleic acids. However, the percentage of conversion into ester in the esterification reaction of capric acid was higher for free CALB. These results suggest that immobilization favored the conversion into esters of fatty acids with larger chain sizes, compared to free CALB. Five cycles of use of the magnetic biocatalyst BioS2 were conducted, which maintained 50% of the initial ethyl oleate conversion percentage. It can be stated that a new magnetic biocatalyst was obtained based on CALB immobilized in magnetic poly(styrene-co-divinylbenzene) and demonstrated to be suitable for esterification reactions of ethyl esters from aliphatic fatty acids with different carbon chain lengths.

Keywords: magnetic biocatalyst; magnetic polymer; immobilized lipase; esterification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Esquema do comportamento magnético dos biocatalisadores na presença de um campo magnético (A), publicações por país (B) e publicações por área de pesquisa (C).....	19
Figura 2 -	Modelo molecular de lipase B de <i>Candida antarctica</i>	25
Figura 3 -	Mecanismo catalítico das lipases em reações de hidrólise.....	26
Figura 4 -	Mecanismo catalítico das lipases em reações de esterificação.....	27
Figura 5 -	Fenômeno de ativação interfacial.....	29
Figura 6 -	Principais métodos de imobilização de enzimas.....	32
Figura 7 -	Morfologias para microesferas magnéticas.....	38
Figura 8 -	Sistema experimental utilizado na síntese de partículas de SP-DVB magnéticas.....	40
Figura 9 -	Relação da porosidade dos suportes com o acesso da solução enzimática.....	44
Figura 10 -	Estrutura cristalina da magnetita (A) e da maghemita (B).....	47
Figura 11 -	Ilustração dos possíveis modos de coordenação do oleato aos íons ferro da superfície das nanopartículas de óxido de ferro.....	49
Figura 12 -	Mecanismo de modificação e incorporação da magnetita à matriz polimérica.....	50
Figura 13 -	Organograma de atividades.....	58
Figura 14 -	Sistema operacional da polimerização.....	62
Figura 15 -	Unidade experimental para o pré-tratamento dos suportes.....	66
Figura 16 -	Unidade experimental empregada para as reações de esterificação.....	73
Figura 17 -	Recuperação dos biocatalisadores ao final das reações de esterificação....	76
Figura 18 -	Espectros de FTIR da magnetita (M), da magnetita modificada (MAO) e do ácido oleico (AO).....	78
Figura 19 -	Curvas de degradação térmica e derivada da perda de massa da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M).....	79

Figura 20 -	Difratograma de raios X da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M).....	81
Figura 21 -	Curvas de magnetização da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M).....	82
Figura 22 -	Micrografias de microscopia ótica dos suportes magnéticos sintetizados.....	84
Figura 23 -	Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos suportes magnéticos preparados com 50% de grau de diluição.....	84
Figura 24 -	Micrografias de varredura eletrônica dos suportes preparados com 100% de grau de diluição.....	85
Figura 25 -	Micrografias de varredura eletrônica dos suportes preparados com 150% de grau de diluição.....	85
Figura 26 -	Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos suportes magnéticos sintetizados com 50% (S1) e 150% (S3) de diluição em <i>n</i> -heptano.....	87
Figura 27 -	Isotermas de adsorção de dessorção de nitrogênio dos suportes magnéticos.....	90
Figura 28 -	Distribuição dos tamanhos de poros dos suportes magnéticos.....	91
Figura 29 -	Composição dos elementos analisados nos suportes magnéticos por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS).....	94
Figura 30 -	Espectro de FTIR dos suportes magnéticos obtidos.....	95
Figura 31 -	Difratograma de raios X da magnetita (M) e dos suportes magnéticos (S).....	97
Figura 32 -	Curvas de degradação térmica e derivada da perda de massa dos suportes magnéticos.....	98
Figura 33 -	Curvas de magnetização dos suportes magnéticos.....	101
Figura 34 -	Comportamento dos suportes magnéticos na presença de um campo magnético em uma mistura de ácido oleico e etanol 1:2 (A) e solução aquosa de fosfato de sódio 5 mM (B).....	101
Figura 35 -	Cinética de imobilização da lipase B de <i>Candida antarctica</i> em suportes magnéticos baseada na quantidade de proteína presente no sobrenadante ao longo da imobilização (A) e na atividade hidrolítica do sobrenadante ao longo do processo de imobilização (B).....	103
Figura 36 -	Recuperação dos biocatalisadores ao final da reação de hidrólise: (A) BioS1, (B) BioS2 e (C) BioS3.....	105

Figura 37 -	Estrutura química dos substratos <i>p</i> -NFL e <i>p</i> -NFB.....	106
Figura 38 -	Ilustração do suporte S2 (A) e do biocatalisador BioS2 (B).....	110
Figura 39 -	Influência da temperatura na atividade de esterificação e conversão do ácido oleico em oleato de etila. Biocatalisador preparado a partir do suporte magnético S2 e CALB livre – Enzima comercial Lipozyme® CALB (novozymes).....	111
Figura 40 -	Atividade de esterificação e conversão de ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia. Biocatalisador preparado a partir do suporte magnético S2 e CALB livre – Enzima comercial Lipozyme® CALB (novozymes).....	112
Figura 41 -	Estrutura química dos ácidos graxos utilizados.....	113
Figura 42 -	Reuso do biocatalisador (BioS2).....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Definição, vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização.....	32
Tabela 2 -	Panorama do estudo de lipases imobilizadas em suportes poliméricos sintéticos magnéticos.....	52
Tabela 3 -	Composição da fase orgânica para a preparação dos suportes magnéticos.....	61
Tabela 4 -	Dados quantitativos de XRD da magnetita produzida (M).....	81
Tabela 5 -	Dados quantitativos de VSM da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M).....	83
Tabela 6 -	Características dos suportes magnéticos obtidos.....	89
Tabela 7 -	Valores teóricos das bandas de absorção na região do infravermelho de poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno) com magnetita.....	95
Tabela 8 -	Temperaturas de degradação térmica dos suportes magnéticos.....	98
Tabela 9 -	Parâmetros obtidos pela análise de VSM dos suportes magnéticos.....	100
Tabela 10 -	Parâmetros de imobilização, atividades enzimáticas e conversão de oleato de etila dos biocatalisadores magnéticos obtidos.....	109

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 -	Equação de Scherrer.....	60
Equação 2 -	Determinação da densidade aparente (D_{ap}) dos suportes magnéticos.....	64
Equação 3 -	Determinação do grau de inchamento dos suportes magnéticos.....	65
Equação 4 -	Atividade de hidrólise da enzima solúvel.....	68
Equação 5 -	Atividade de hidrólise do biocatalisador	69
Equação 6 -	Rendimento de imobilização (%).....	70
Equação 7 -	Acidez das alíquotas coletadas.....	72
Equação 8 -	Conversão de substratos em produtos (%).....	72
Equação 9 -	Atividade de esterificação dos biocatalisadores magnéticos (U/g_{bio}).....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AH	Atividade hidrolítica da enzima solúvel
AH _{bio}	Atividade hidrolítica do biocatalisador
AIBN	Azo-bis-isobutironitrila
ASAP	Análise de área específica e porosidade
BSA	Albumina sérica bovina
BioS1	Biocatalisador preparado a partir do suporte S1
BioS2	Biocatalisador preparado a partir do suporte S2
BioS3	Biocatalisador preparado a partir do suporte S3
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
D _{ap}	Densidade aparente
DVB	Divinilbenzeno
XRD	Difratometria de raios X
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
<i>f</i>	Fator de correlação da curva de calibração do <i>p</i> -nitrofenol
I	Grau de inchamento
<i>K</i>	Fator de correlação da curva de calibração do BSA
M	Magnetita
MAO	Magnetita modificada com ácido oleico
m _s	Massa de suporte
m _{bio}	Massa de biocatalisador
SEM	Microscopia eletrônica de varredura
OM	Microscopia ótica

NPMs	Nanopartículas magnéticas
<i>p</i> -NF	<i>p</i> -Nitrofenol
<i>p</i> -NFL	Laurato de <i>p</i> -nitrofenila
PVA	Poli (acetato de vinila)
Ri	Rendimento de imobilização
S-DVB-MAO	Poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno) magnético
S1	Poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno) magnético preparado com 50% (m/v) de diluição em <i>n</i> -heptano
S2	Poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno) magnético preparado com 100% (m/v) de diluição em <i>n</i> -heptano
S3	Poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno) magnético preparado com 150% (m/v) de diluição em <i>n</i> -heptano
TG	Termogravimetria
T _{máx}	Temperatura na qual a velocidade de degradação é máxima
T _{onset}	Temperatura inicial de degradação
U _e	Atividade enzimática oferecia no início do processo de imobilização (Atividade de entrada)
U _s	Atividade enzimática do sobrenadante ao final da imobilização (Atividade de saída)
U _{teo}	Atividade teórica do biocatalisador
U _{teo} /g _{bio} %	Atividade teórica adsorvida por grama de suporte
V _e	Volume de solução enzimática devidamente diluída
V _f	Volume final do meio reacional
VSM	Magnetômetro de amostra vibrante

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	14
1	OBJETIVOS.....	16
1.1	Objetivo geral.....	16
1.2	Objetivos específicos.....	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	Biocatalisadores magnéticos.....	17
2.2	Reações catalisadas por lipases.....	20
2.3	Estrutura tridimensional das lipases.....	21
2.3.1	<u>Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB).....</u>	23
2.4	Mecanismo catalítico das lipases.....	25
2.5	Ativação interfacial das lipases.....	26
2.6	Imobilização enzimática.....	28
2.6.1	<u>Métodos de imobilização enzimática.....</u>	30
2.7	Características gerais dos suportes.....	33
2.7.1	<u>Tipos de suportes para a imobilização de enzimas.....</u>	34
2.8	Suportes poliméricos magnéticos.....	36
2.8.1	<u>Polimerização em suspensão.....</u>	37
2.8.1.1	Tipos de polimerização em suspensão.....	39

2.8.1.2	Efeito do diluente	40
2.8.2	<u>Preparo da magnetita por coprecipitação</u>	43
2.8.2.1	Estrutura cristalina e propriedade superparamagnética	45
2.8.2.2	Estabilização de nanopartículas de magnetita	47
3	METODOLOGIA	53
3.1	 Materiais	53
3.1.1	<u> Reagentes e procedências</u>	53
3.1.2	<u> Equipamentos e acessórios</u>	55
3.2	 Metodologia de preparo dos suportes magnéticos	57
3.2.1	<u> Síntese da magnetita seguida de modificação com ácido oleico</u>	59
3.2.2	<u> Caracterização da magnetita modificado e não modificado</u>	59
3.2.3	<u> Obtenção dos suportes de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnéticos</u>	61
3.2.4	<u> Caracterização dos suportes magnéticos</u>	63
3.3	 Metodologia de preparo do biocatalisador magnético	66
3.3.1	<u> Pré-tratamento dos suportes</u>	66
3.3.2	<u> Imobilização de CALB nos suportes magnéticos</u>	67
3.3.3	<u> Determinação da atividade hidrolítica da lipase solúvel e dos biocatalisadores magnéticos</u>	68
3.3.4	<u> Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford</u>	70
3.3.5	<u> Avaliação da atividade de esterificação e conversão do ácido oleico em oleato de etila</u>	71
3.3.6	<u> Estudo de influência da temperatura na esterificação</u>	73

3.3.7	<u>Influência da imobilização sobre a especificidade das enzimas aos substratos ácidos graxos.....</u>	74
3.3.8	<u>Avaliação do reuso do biocatalisador.....</u>	76
3.3.9	<u>Avaliação da estabilidade da enzima imobilizada.....</u>	77
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	77
4.1	Caracterização da magnetita	78
4.2	Caracterização dos suportes magnéticos.....	83
4.3	Caracterização dos biocatalisadores magnéticos.....	102
	CONCLUSÕES.....	118
	REFERÊNCIAS.....	120

INTRODUÇÃO

As enzimas são biocatalisadores proteicos sintetizados por animais, vegetais e microrganismos (Ndochinwa *et al.*, 2024). As reações catalisadas por enzimas geram um grande interesse comercial, pois atuam sob condições operacionais mais brandas, possuem baixo tempo de reação, baixo consumo de energia e menor produção de resíduos, em comparação aos catalisadores convencionais (Khan *et al.*, 2017). Além disso, apresentam também altas atividade, seletividade e especificidade, com uma ampla faixa de substratos (Cao; Liu, 2009; Koeller; Wong, 2001).

As lipases (triacilglicerol glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) têm recebido especial interesse industrial, pois catalisam a hidrólise de triglicerídeos formados a partir de ácidos graxos de cadeia longa de diversos comprimentos de cadeia, liberando ácidos graxos e álcoois (glicerol). Em meios com pouca água catalisam a reação inversa, de esterificação de ácidos graxos (Vadgama *et al.*, 2015). Além de catalisar reações como, interesterificação (Jenab *et al.*, 2014), transesterificação (Xu *et al.*, 2018), aminólise (Mouad *et al.*, 2016), glicólise (Castro; Carniel, 2017), acidólise (Tecelão *et al.*, 2012) e alcoólise (Valverde *et al.*, 2014). Apresentam também relativa estabilidade operacional e, dentre suas características mais importantes comercialmente, possível região e estereoespecificidade, além de elevada enantiosseletividade (Kapoor; Gupta, 2012).

O emprego das lipases em escala industrial possui alguns desafios como, a baixa estabilidade operacional em condições industriais, alto custo associado às enzimas e não reutilização do biocatalisador. No entanto, a imobilização enzimática é uma estratégia para superar estas limitações (Cipolatti *et al.*, 2019). As lipases imobilizadas são mais facilmente recuperadas, diminuindo o risco de contaminação do produto. Tornam-se reutilizáveis e podem ser empregadas em processos reacionais contínuos (Sheldon; Pelt, 2013). Além disso, diversas propriedades enzimáticas podem ser melhoradas; como atividade, termoestabilidade e estabilidade em solventes orgânicos, mesmo em pH adverso (Dong *et al.*, 2024; Dos Santos *et al.*, 2017). Estas vantagens refletem na diminuição dos custos totais do processo de produção favorecendo o emprego de lipases em processos industriais (Virgen-Ortiz *et al.*, 2016).

Os polímeros sintéticos magnéticos têm recebido destaque como suportes enzimáticos, pois, geralmente, apresentam baixo custo, fácil produção e possibilidade de manipulação de suas características visando potencializar a interação com a enzima (Del Arco *et al.*, 2021). Além disso, em função de sua propriedade superparamagnética, apresentam uma expressiva facilidade de recuperação do meio reacional, reutilização e possibilidade de agitação magnética, potencializando o desempenho operacional do biocatalisador (Thévenot *et al.*, 2013). A magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) destacam-se como as partículas magnéticas mais empregadas para o desenvolvimento de biocatalisadores, pois apresentam fácil preparo, baixo custo, alta magnetização de saturação e baixa coercitividade (Silva *et al.*, 2022).

Embora muitos trabalhos na literatura tenham estudado diferentes matrizes para a imobilização de enzimas, estudos ainda são necessários para ampliar o progresso científico dos biocatalisadores poliméricos magnéticos em busca de materiais com propriedades cada vez melhores, que favoreçam a estabilidade de lipases imobilizadas e possibilitem a geração de biocatalisadores magnéticos capazes de serem empregados em diversas aplicações (Melo *et al.*, 2023). Os polímeros sintéticos magnéticos obtidos na presente Dissertação são uma alternativa para o desenvolvimento de biocatalisadores aprimorados. Aspectos como porosidade, área específica e perfil magnético destes materiais serão estudados a fim de avaliar a relação da morfologia dos polímeros magnéticos com a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* e com o desempenho do biocatalisador. Assim, visando contribuir com o avanço do desenvolvimento da catálise enzimática.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Desenvolvimento de um novo biocatalisador magnético à base de lipases B de *Candida antarctica* imobilizada em suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnéticos com diferentes morfologias, estudo da relação entre a estrutura dos suportes com os parâmetros de imobilização e avaliação do biocatalisador em reações de esterificação.

1.2 Objetivos específicos

- Investigar a influência da morfologia dos suportes nos parâmetros de imobilização;
- Estudar a influência da morfologia dos suportes no potencial dos biocatalisadores obtidos na conversão de ácidos graxos em ésteres;
- Avaliar a influência da temperatura nas reações de esterificação empregando o biocatalisador obtido com melhor desempenho;
- Estudar a especificidade ao tamanho de cadeia carbônica de ácidos graxos alifáticos do biocatalisador obtido com melhor desempenho, em comparação a enzima livre;
- Avaliar o reuso do biocatalisador magnético obtido com melhor desempenho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Muitos biocatalisadores enzimáticos têm sido estudados, considerando sua importância na transição para processos menos prejudiciais ao meio ambiente e eficientes nas indústrias modernas (Levy *et al.*, 2025; Zhang *et al.*, 2025 Parandi *et al.*, 2023). Nesse sentido, diversos materiais surgem como opções para o desenvolvimento de suportes, como sílica, fibras, polímeros naturais, polímeros sintéticos, entre outros (Yin *et al.*, 2025; Ribeiro *et al.*, 2022; Aziz *et al.*, 2022; Sulman *et al.*, 2022). Sabe-se que as características do suporte afetam diretamente as propriedades catalíticas das enzimas, além de influenciar sua estabilidade e permitir seu reuso.

Embora não haja um consenso em relação ao melhor suporte para uma enzima, sabe-se que muitos parâmetros morfológicos do suporte podem afetar o desempenho de um biocatalisador em um sistema reacional. Parâmetros como área específica, volume de poros e diâmetro de partículas são apenas alguns exemplos de características do suporte que podem influenciar no sistema enzima-substrato. Fatores reacionais como temperatura, agitação e viscosidade do substrato também influenciam diretamente na biocatálise. Logo, desenvolver materiais resistentes, que permitam uma boa interação enzima-substrato e que possam ser reutilizados, além de permitirem uma maior estabilização da enzima no meio podem contribuir significativamente para o avanço da área e aumentar o leque de opções de aplicação das enzimas. Na busca por um suporte adequado para cada tipo de enzima e cada aplicação desejada, os suportes magnéticos têm se destacado.

2.1 Biocatalisadores magnéticos

A imobilização de lipases em suportes magnéticos confere vantagens em comparação aos demais biocatalisadores heterogêneos. O comportamento superparamagnético dos suportes permite a recuperação magnética do biocatalisador através da aplicação de um campo magnético (Silva *et al.*, 2024). Com isso, otimizando o processo operacional do emprego dos biocatalisadores, uma vez que etapas de centrifugação ou filtração para a separação do biocatalisador do meio reacional ao final das reações deixam de ser necessárias. Adicionalmente, o comportamento magnético dos suportes confere a possibilidade de agitação via campo magnético no meio reacional, o que pode aumentar a vida útil do biocatalisador (uma vez que o atrito do biocatalisador com um magneto, com um impelidor de agitadores mecânicos ou com as laterais dos reatores pode danificar as partículas ou lixiviar as enzimas dos suportes) (Cipolatti *et al.*, 2019). A Figura 1 (A) ilustra o comportamento de recuperação e agitação via campo magnético.

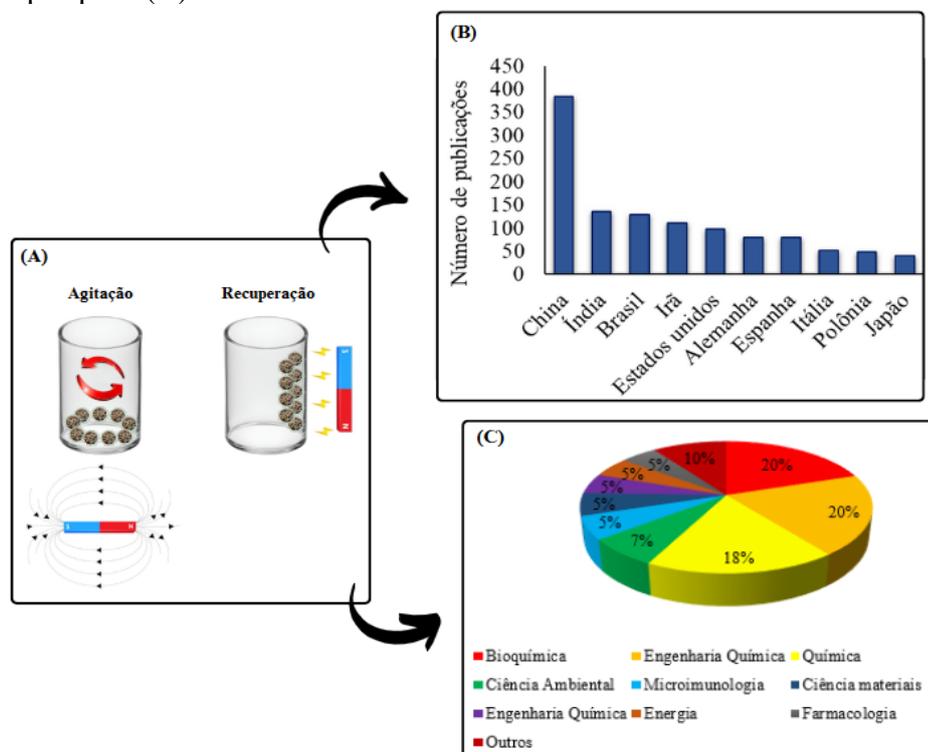
O processo operacional simplificado e o aumento da eficiência operacional do biocatalisador refletem em bioprocessos mais econômicos (Del Arco *et al.*, 2021; Al-Qodah *et al.*, 2018; Ghantzou; Patila; Stamatis, 2018). Além disso, os biocatalisadores magnéticos também são muito versáteis, possuindo aplicação potencial em diversos setores industriais, como a indústria de alimentos (Mohammadi *et al.*, 2019; Huang *et al.*, 2018), de biocombustíveis (Zhang *et al.*, 2020a; Paintaid; H-Kittikun, 2020), farmacêutica (Noori *et al.*, 2023, Rahimi *et al.*, 2023; Sikora *et al.*, 2017), de biorremediação (Zhang *et al.*, 2020b; Gao *et al.*, 2019), entre outras.

Vale ressaltar que existem obstáculos para a implementação de biocatalisadores magnéticos na indústria. Esta biotecnologia necessita de campos magnéticos potentes e homogêneos para uma agitação eficiente, o que requer, em geral, equipamento de alto custo. Além disso, o sistema do equipamento deve ser programado para diferentes suportes magnéticos, a fim de se obter uma resposta magnética adequada que garanta agitação e recuperação eficientes (Ghantzou; Patila; Stamatis, 2018). Contudo, existem aplicações em que o emprego de biocatalisadores magnéticos é fortemente recomendado (Del Arco *et al.*, 2021), como por exemplo em reações com meio reacional de alta viscosidade (Meng *et al.*, 2013). E

por isso, muitos trabalhos na literatura tem se empenhado em melhorar as características dos biocatalisadores magnéticos em escala laboratorial, objetivando viabilizar a implementação em escala industrial (Melo *et al.*, 2023).

Analisando as publicações nesta temática ao longo dos últimos anos utilizando a plataforma *Scopus*, se nota um aumento no número de publicações sobre biocatalisadores. O Brasil está entre os países que mais publicam sobre esta temática (Figura 1, B). E as áreas de conhecimento que mais abordam este assunto são: bioquímica, engenharia química e química; respectivamente (Figura 1, C). A diversidade de possíveis aplicações industriais para estes biocatalisadores, somada a possibilidade de menor geração de resíduos (em comparação aos catalisadores convencionais) e a característica superparamagnética (que pode permitir recuperação e agitação otimizadas via campo magnético), desperta grande interesse científico para o aprimoramento desta tecnologia e dos bioprocessos associados, com a finalidade de viabilizar a implementação em escala industrial (Del Arco *et al.*, 2021).

Figura 1- Esquema do comportamento magnético dos biocatalisadores na presença de um campo magnético (A), publicações por país (B) e publicações por área de pesquisa (C)



Nota: Para o levantamento de dados presente nos gráficos (B) e (C) foram considerados os seguintes parâmetros; a Scopus como plataforma de pesquisa, “*magnetic biocatalyst*” como palavra-chave, incluindo artigos experimentais e de revisão em inglês, considerando os anos de 2014 a 2025.

Fonte: A autora, 2025.

2.2 Reações catalisadas por lipases

As lipases (EC 3.1.1.3) são uma das classes de enzimas mais empregadas para o desenvolvimento de biocatalisadores heterogêneos de interesse comercial (Chandra *et al.*, 2020). Seus substratos naturais são os ésteres de ácidos graxos, geralmente triglicerídeos, insolúveis ou parcialmente insolúveis de cadeia média a longa (C₆-C₂₂) (Zhao *et al.*, 2020). Estas enzimas não requerem um cofator (Rajendran; Palanisamy; Thangavelu, 2008), são relativamente estáveis e comumente ativas em solventes orgânicos. Como todos os catalisadores convencionais, as lipases não são consumidas ou alteradas permanentemente após sua participação em uma reação (Choudhury; Bhunia, 2015).

As lipases em condições não aquosas podem catalisar reações de esterificação (Adak; Banerjee, 2016), transesterificação (Tomke; Rathod, 2015); interesterificação (Soares *et al.*, 2013), acidólise (Palla; Pacheco; Carrín, 2012), alcoólise (Wang *et al.*, 2012) e aminólise (Zeng *et al.*, 2018) em solventes orgânicos. A capacidade das lipases de catalisar essas reações com grande eficiência, versatilidade, especificidade e relativa estabilidade torna-as altamente atrativas do ponto de vista comercial (Sharma; Kanwar, 2014).

Com isso, de modo geral, as lipases são biocatalisadores versáteis que possuem aplicação potencial em diferentes setores industriais, como por exemplo nas indústrias de alimentos para a modificação da gordura do leite (Chen *et al.*, 2021), a síntese de ésteres de sacarose e frutose (Ye *et al.*, 2016; Neta *et al.*, 2012), a síntese de gordura do leite lipolisada (LMF) de realce de sabor (Peng *et al.*, 2014) e síntese de emulsificantes alimentares (Huang *et al.*, 2013); na indústria têxtil para a modificação de tecidos de poliéster (Gao *et al.*, 2017; Toprak; Anis, 2020) e na remoção de manchas em tecidos de algodão (Jacob; Suthindhiran, 2020); na indústria cosmética para a síntese de éster isopropílico à base de óleo de camélia (componente de compostos para massagens e sabões líquidos) (Liu *et al.*, 2012a) e para a síntese de amidas graxas (moléculas anfífilas empregadas em produtos cosméticos) (Mouad *et al.*, 2016).

As lipases são importantes catalisadores para a indústria farmacêutica principalmente na síntese de fármacos quirais, como por exemplo na síntese do intermediário quiral da

pregabalina (fármaco anticonvulsivante) (Ding *et al.*, 2018), a síntese quimioenzimática de (S)-Pindolol (fármaco beta bloqueador) (Lima *et al.*, 2017) e a síntese enantiosseletiva do (R,S)-flurbiprofeno (fármaco anti-inflamatório não esteroideal) (Zhao *et al.*, 2017). Além de aplicações no tratamento de efluentes (Liu *et al.*, 2012b), na síntese de compostos nutracêuticos (Rychlicka; Gliszczynska, 2020), no desenvolvimento de biossensores (Wang *et al.*, 2019), na biorremediação de óleos (Tongco *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2012), na síntese de biocombustíveis (Li *et al.*, 2020; Cho *et al.*, 2012) e biolubrificantes (Fernandes *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020c) entre outras aplicações. Compreender as características das enzimas é fundamental para o preparo de biocatalisadores adequados para cada aplicação desejada.

2.3 Estrutura tridimensional das lipases

A estrutura das lipases consiste em um enovelamento proteico de α/β - hidrolases que se trata, basicamente, de uma folha β central rodeada, em ambas as faces, por α -hélices. Esse é o tipo de enovelamento proteico mais comum e versátil encontrado na natureza, tendo sido registrado em outros tipos de enzimas (Nakamura, 2020). O sítio ativo das lipases é formado por uma tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico ou ácido glutâmico (Kapoor; Gupta, 2012). O aminoácido serina possui um resíduo nucleofílico chave (Nakamura, 2020) que é conservado na tríade catalítica dentre os diferentes tipos de lipase (Contesini *et al.*, 2020). O sítio de ligação hidrofóbico pode ser do tipo fenda localizado próximo à superfície da proteína ou semelhante a um funil ou a um túnel, não há um consenso quanto ao formato do sítio ativo (Khan *et al.*, 2017).

Além da tríade catalítica, há outros dois resíduos necessários para catálise, estes resíduos que compõem o buraco de oxianion, ocorrem de maneira conservada em lipases e são orientados tridimensionalmente de maneira similar em todas as estruturas (Nakamura, 2020). O buraco oxianion auxilia na estabilização do estado de transição dos substratos durante a catálise. Durante o processo catalítico, um intermediário tetraédrico carregado negativamente é gerado, os aminoácidos do buraco oxianion estabelecem ligações não covalentes com o íon

oxigênio formado deslocando a densidade eletrônica de modo a favorecer a formação deste estado de transição. A região catalítica das lipases possui um dos resíduos do buraco oxianion posicionado adjacente ao aminoácido nucleófilo serina, enquanto o segundo resíduo está localizado entre a fita β_3 e a hélice α (Contenisi *et al.*, 2020).

A maioria das lipases também possuem uma estrutura proteica semelhante a uma tampa ou aba, composta por uma ou mais α -hélices de comprimento variável, que cobre totalmente ou parcialmente o sítio ativo (Khan *et al.*, 2017). A tampa é uma estrutura anfipática que realiza um movimento que gira em torno de duas regiões de dobradiça, também chamado de domínio de pálpebra (Yu *et al.*, 2012), na interface lipídio-água do meio reacional. Em meios aquosos puros, a tampa é predominantemente fechada, ao passo que na presença de uma camada hidrofóbica (substrato ou suporte hidrofóbico), ela é parcialmente aberta. Na conformação fechada, seu lado hidrofílico está voltado para o solvente, enquanto o lado hidrofóbico é direcionado para o sítio catalítico. À medida que o meio reacional apresenta substratos ou suportes hidrofóbicos, a enzima muda para a conformação aberta, a face hidrofóbica fica exposta permitindo o acesso do substrato ao sítio catalítico. Portanto, não apenas a natureza anfipática da tampa, mas também sua sequência específica de aminoácidos é importante para a atividade e especificidade das lipases (Khan *et al.*, 2017).

A atividade e a termoestabilidade das lipases podem ser alteradas por modificações em seus domínios de tampa (Timucin; Sezerman, 2013). Zhu *et al.* (2013) substituíram aminoácidos na região da *lid* (tampa) da lipase de *Rhus chinensis* e demonstraram que isto afetou a especificidade ao substrato e a termoestabilidade da lipase (Zhu *et al.*, 2013). Yu *et al.* (2012) demonstraram que a introdução de uma ligação dissulfeto na região da tampa da lipase de *Rhus chinensis* aumenta a termoestabilidade e altera a especificidade do comprimento da cadeia acila devido à estabilização da estrutura geométrica da região (Yu *et al.*, 2012). Yang *et al.* (2015) caracterizaram a lipase termoestável de *Pseudomonas sp.* (R0-14) e verificaram que, quando a tampa está na conformação aberta, a proporção de α -hélices aumenta (Yang *et al.*, 2015). Um aumento no número de α -hélices pode tornar a lipase mais termoestável na conformação aberta (Dror *et al.*, 2014).

É importante mencionar também, que existem relatos de lipases sem tampa, com mini tampa e até com duas tampas (Cheng *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2012). Cheng *et al.* (2012) empregaram abordagens computacionais para comparar as estruturas terciárias em conformações fechadas e abertas. Observaram que a lipase de *Pseudomonas spp.* (MIS38) tem

duas tampas e que alteram muito sua conformação após a ligação do substrato. Eles propuseram que uma superfície hidrofóbica é formada por essas tampas, necessárias para manter os substratos firmemente no sítio ativo (Cheng *et al.*, 2012). Xu *et al.* (2012) relataram uma nova tampa em conformação em alça na estrutura de *Malassezia globosa* LIP1 (SMG1). A SMG1 é um dos poucos membros da família das lipases fúngicas que se mostrou estritamente específica para mono e diacilgliceróis. Foi sugerido que na conformação aberta, os dois resíduos hidrofóbicos volumosos adjacentes ao sítio catalítico e a região de dobradiça da tampa podem estar promovendo estereoidimpedimento à ligação de triacilgliceróis, justificando sua especificidade (Xu *et al.*, 2012).

2.3.1 Lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

A lipase B de *Candida antarctica* (CALB) é uma proteína globular constituída por 317 aminoácidos, apresentando dimensões de 30Å x 40Å x 50Å, massa molecular de 33 kDa e ponto isoelétrico de 6,0 (Strzelczyk *et al.*, 2016, Uppenberg *et al.*, 1994). A CALB foi a enzima escolhida nesta Dissertação pois, de acordo com a literatura, geralmente apresenta alta atividade de esterificação com uma ampla faixa de substratos (Silva *et al.*, 2024; Soleymani *et al.*, 2023, Aftal *et al.*, 2020; Chiaradia *et al.*, 2016) e capacidade de se adsorver adequadamente a superfícies hidrofóbicas (Ribeiro *et al.*, 2022; Cunha *et al.*, 2014). Existem algumas características que tornam a CALB amplamente utilizada, como boa estabilidade, a possibilidade de produção de produtos opticamente puros, reações de esterificação com altas conversões e atividade, além de boa interação eletrostática com superfícies hidrofóbicas (E Cunha *et al.*, 2019).

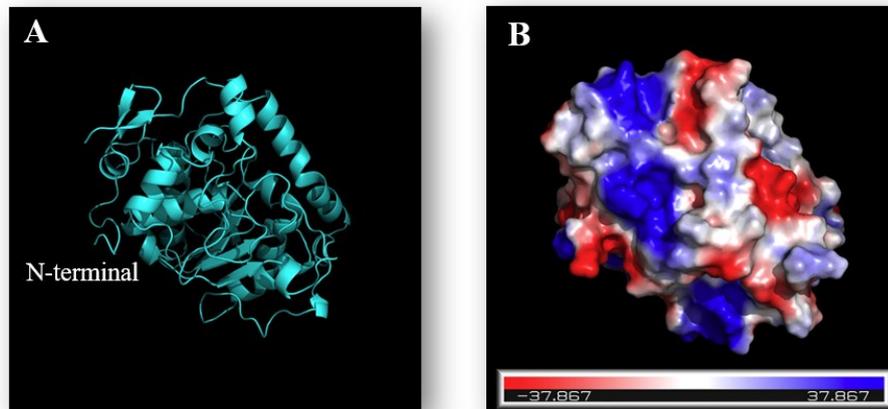
O grande destaque destas enzimas se deve ao fato de, na maioria dos casos, não exigirem que o substrato atinja a concentração micelar crítica para sofrer ativação interfacial e assim, iniciar a conversão de substratos em produtos; em contraste com outras lipases que necessitam deste fenômeno para iniciar a conversão (Fé *et al.*, 2024; Stauch; Fisher; Cianci, 2019). Este fenômeno ocorre devido a tampa muito pequena da CALB, que não é capaz de

isolar totalmente o centro ativo na forma fechada (E Cunha *et al.*, 2019; Uppenberg *et al.*, 1995). Apesar da pequena tampa, inúmeros estudos na literatura descrevem sua atividade catalítica e sua adsorção a superfícies hidrofóbicas por meio do mecanismo de ativação interfacial (Mateo *et al.*, 2007; Palomo *et al.*, 2002; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998).

A Lipozyme® CALB (empresa Novozymes), que consiste na lipase B de *Candida antarctica* (CALB) comercial foi o biocatalisador livre (não imobilizado) empregado no preparo dos biocatalisadores magnéticos desta Dissertação. A produção de lipases em larga escala é possível através da tecnologia de expressão de proteínas recombinantes heterólogas, que consiste na inserção de um gene ou fragmento de gene em um organismo hospedeiro que não o possui naturalmente. Este processo permite que organismo que não expressam determinada proteína normalmente possam sintetizá-la em escalas necessárias ao uso que se propõem. No caso da Lipozyme® CALB, a produção em larga escala ocorre por meio da inserção do gene que expressa a lipase B de *Candida antarctica* em *Aspergillus niger* (E Cunha *et al.*, 2019; Pinto, 2017).

A Novozym 435 (Novozymes) é um biocatalisador heterogêneo comercial preparado a partir da CALB imobilizada em uma resina acrílica (suporte hidrofóbico macroporoso de metacrilato de metila e butila reticulados com divinilbenzeno) não magnética (VPOC 1600), acredita-se que a CALB tenha sido imobilizada apenas por interações hidrofóbicas, através da técnica de adsorção, sendo uma das enzimas imobilizadas comerciais mais utilizadas descrita na literatura (Yang *et al.*, 2025; Fé *et al.*, 2024; Do Nascimento *et al.*, 2024; Sheng *et al.*, 2024; Zhao *et al.*, 2023). A Figura 2 mostra o modelo molecular da lipase B de *Candida antarctica*.

Figura 2 - Modelo molecular de lipase B de *Candida antarctica*



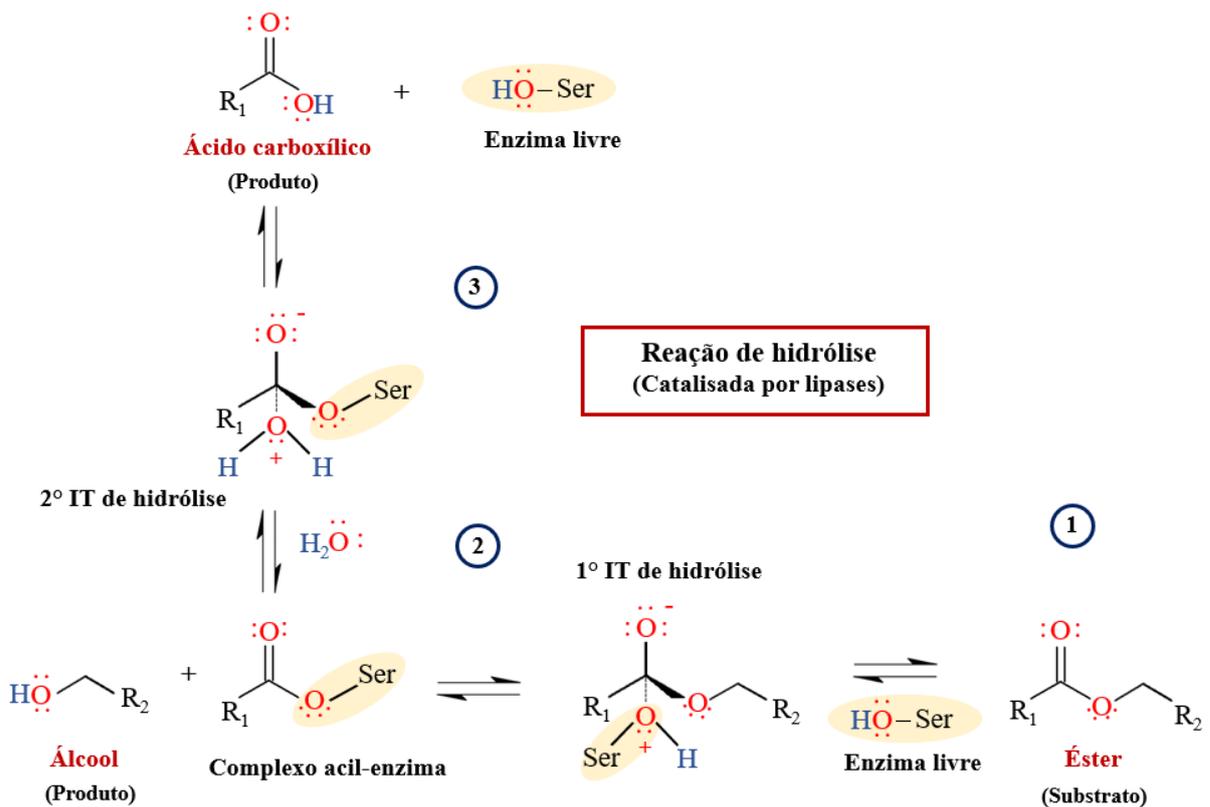
Legenda: Modelo molecular da CALB representado em fita (A) e por densidade eletrônica de superfície (B).
 Fonte: Adaptado de E Cunha *et al.*, 2019.

2.4 Mecanismo catalítico das lipases

A Figura 3 mostra o mecanismo catalítico das lipases em uma reação de hidrólise em equilíbrio. Ele é semelhante ao das serinas-proteases, pois possuem a tríade catalítica conservada entre estas classes de enzima. Em uma reação de hidrólise catalisada por lipases (Figura 3), primeiramente o substrato (um éster) estabelece interações com as lipases que permitem proximidade do substrato com o sítio ativo (Nakamura, 2020). Em seguida, o grupo hidroxila do aminoácido serina (presente no sítio ativo da lipase) faz um ataque nucleofílico ao carbono do grupo carbonila presente na ligação éster do substrato (Kapoor; Gupta, 2012) formando um intermediário tetraédrico (Figura 3, etapa reacional 1) que, por sua vez, é estabilizado pelos outros aminoácidos da tríade, histidina, ácido aspártico ou ácido glutâmico e também pelo buraco do oxianion (Nakamura, 2020). O colapso desse intermediário libera a fração álcool do éster, formando o complexo acil-enzima, no qual a fração acil está covalentemente ligada à serina, e posteriormente, há o ataque nucleofílico de uma molécula de água a este complexo acil-enzima, formando o segundo intermediário tetraédrico da reação

(Figura 3, etapa reacional 2). O colapso do segundo intermediário leva a liberação do ácido carboxílico (produto da hidrólise de ésteres) e da enzima livre (Nakamura, 2020).

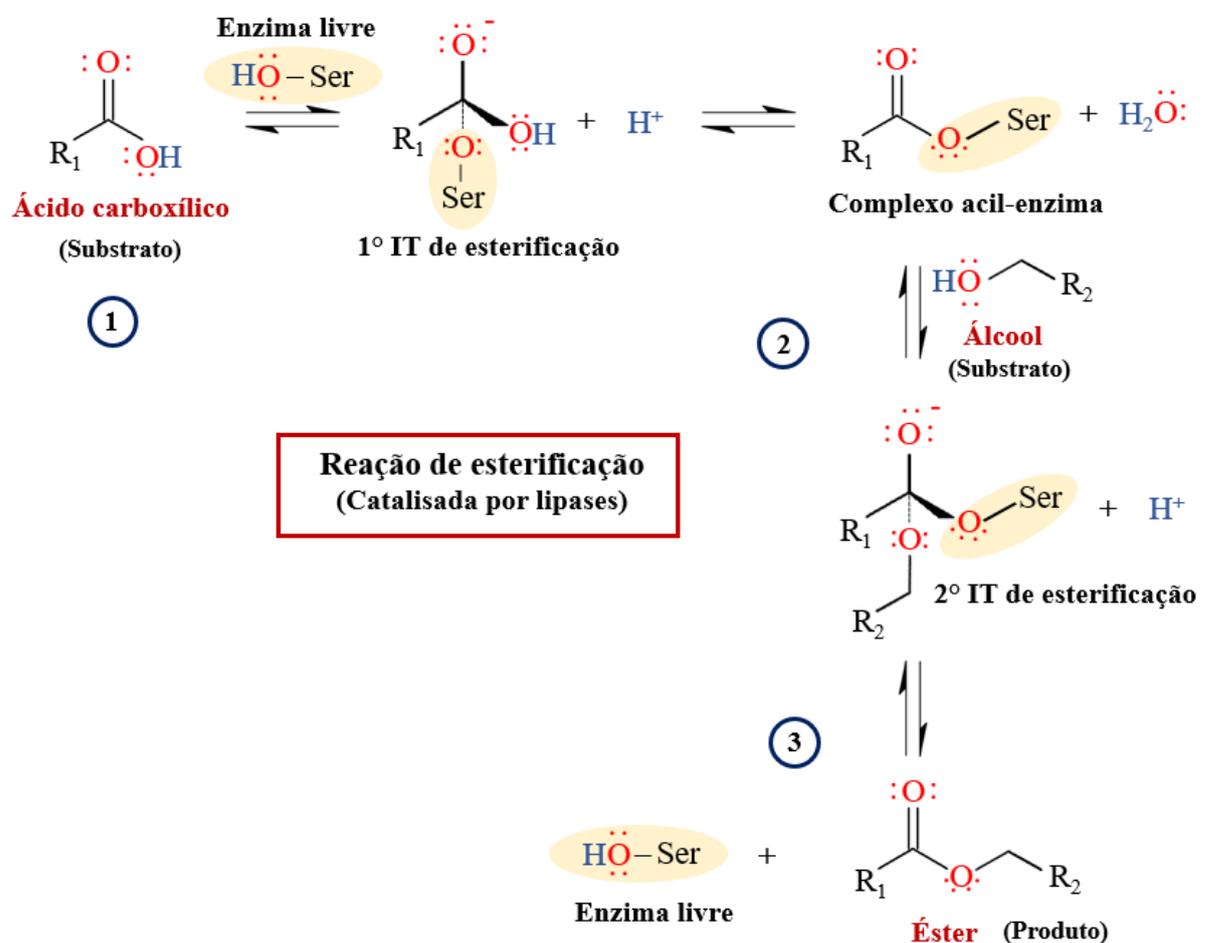
Figura 3 - Mecanismo catalítico das lipases em reações de hidrólise



As lipases catalisam tanto reações de hidrólise quanto reações inversas, de esterificação (Nakamura, 2020). A Figura 4 mostra o mecanismo catalítico das lipases em uma reação de esterificação em equilíbrio. Primeiramente o primeiro substrato da reação (um ácido carboxílico) estabelece interações com as lipases que permitem proximidade do substrato com o sítio ativo (Nakamura, 2020). Em seguida, o grupo hidroxila do aminoácido serina (presente no sítio ativo da lipase) faz um ataque nucleofílico ao carbono do grupo carboxila presente no substrato (Kapoor; Gupta, 2012) formando o primeiro intermediário tetraédrico da reação (Figura 4, etapa reacional 1) que, por sua vez, é estabilizado pelos outros aminoácidos da tríade, histidina, ácido aspártico ou ácido glutâmico e também pelo buraco do oxianion (Nakamura, 2020). O colapso do primeiro intermediário libera uma molécula de água como subproduto da

reação, formando o complexo acil-enzima, no qual a fração acil está covalentemente ligada à serina (Figura 4, etapa reacional 2). Posteriormente, há o ataque nucleofílico ao complexo acil-enzima por uma molécula de álcool (segundo substrato da reação), formando o segundo intermediário tetraédrico e em seguida, o colapso deste intermediário leva a liberação de éster (produto de esterificação) e da enzima livre (Figura 4, etapa reacional 3) (Nakamura, 2020).

Figura 4 - Mecanismo catalítico das lipases em reações esterificação



Legenda: IT – Intermediário tetraédrico; Ser – serina (representa o resíduo catalítico das lipases).
 Fonte: Segundo o mecanismo descrito por Nakamura, 2020.

É importante salientar que as ligações não covalentes dos intermediários tetraédricos (ITs) com aminoácidos específicos da estrutura das lipases favorecem o deslocamento da densidade eletrônica dos íons formados nos IT, com isso permitindo a formação de estados de

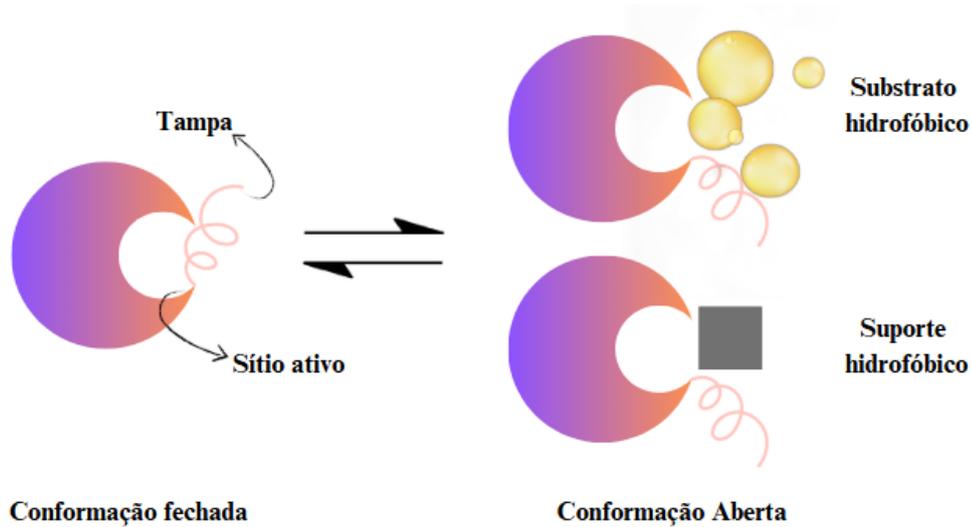
transição mais estáveis, diminuindo a energia de ativação da reação, o que resulta no aumento da velocidade reacional através da catálise enzimática.

2.5 Ativação interfacial das lipases

Os substratos das lipases são pouco solúveis em água e, portanto, a hidrólise normalmente ocorre em uma interface orgânico-aquosa na qual as lipases adsorvem-se a superfície da fase oleosa (substrato) e expressam maior atividade catalítica nestas condições, em comparação as moléculas de substrato dissolvidas na solução aquosa (Adlercreutz, 2013). Para isso, os substratos necessitam de uma concentração mínima na solução, suficiente para ultrapassar o limite de solubilidade a ponto se agregarem formando micelas, são nestas micelas que as lipases se adsorvem e apresentam alta atividade catalítica. Desta forma, a atividade lipolítica das lipases geralmente aumenta significativamente além da concentração micelar crítica do substrato. Esse fenômeno é chamado de ativação interfacial (Nakamura, 2020).

Isto porque a tampa das lipases é uma estrutura anfipática que sofre alterações conformacionais em contato com substratos hidrofóbicos. Basicamente, em solução aquosa a tampa admite uma conformação que protege seus resíduos hidrofóbicos do meio, geralmente esta conformação é denominada “fechada”, pois atrapalha o acesso dos substratos ao sítio ativo da enzima. Na presença de substratos ou suportes hidrofóbicos a tampa realiza um movimento espacial que expõem seus resíduos hidrofóbicos admitindo uma conformação denominada de “aberta”, pois o sítio ativo fica totalmente ou parcialmente exposto o acoplamento da superfície lipídio-água, proporcionando a ativação da enzima, ou adsorção a um suporte hidrofóbico (Rodrigues *et al.*, 2019; Khan *et al.*, 2017). Em um meio reacional, geralmente, mantém-se um equilíbrio das formas aberta e fechada das lipases. Na ausência de substrato lipídico o equilíbrio tende a forma fechada, enquanto na presença de substrato o equilíbrio tende a se deslocar para forma aberta (ativa) da enzima. A Figura 5 ilustra o mecanismo de ativação interfacial e o equilíbrio conformacional entre as formas aberta e fechada das lipases.

Figura 5 - Fenômeno de ativação interfacial



Fonte: Segundo descrito por Rodrigues *et al.*, 2019.

Como a ativação interfacial pode causar um grande aumento na atividade catalítica, é de profunda importância para todas as aplicações de lipases e deve sempre ser considerada ao desenvolver métodos de imobilização enzimática. Vale ressaltar também, que as variações de tampa entre as lipases podem afetar a ativação interfacial. Cheng *et al.* (2012) relataram que a lipase de *Pseudomonas* sp. MIS38 (PML) não sofre ativação interfacial após a exclusão de sua tampa 2, e eles propuseram que a tampa 2 é importante para a ativação interfacial de PML (Cheng *et al.*, 2012).

Uppenberg *et al.* (1994) descreveram que a tampa da lipase B de *Candida antarctica* é tão pequena que não isola totalmente o sítio ativo mesmo na conformação fechada. Com isso, CALB apresenta boa atividade mesmo sem o substrato atingir a concentração micelar crítica, ou seja, sua atividade independe da ativação interfacial mesmo apresentando uma tampa (Uppenberg *et al.*, 1994). Por isso, a existência ou tamanho das tampas não são critérios adequados para determinar a ativação interfacial das lipases, cada lipase possui um perfil de ativação interfacial distinta (Nakamura, 2020). Porém, o papel vital da tampa na seletividade, estabilidade e atividade das lipases foi confirmado por diversos trabalhos na literatura (Khan *et al.*, 2017).

2.6 Imobilização enzimática

De acordo com a 1ª Conferência em Engenharia de Enzimas (realizada em Henniker, Estados Unidos, 1971), as enzimas imobilizadas são catalisadores fisicamente confinados ou localizados em uma região definida do espaço, com retenção de suas atividades catalíticas, e que podem ser utilizados repetida e continuamente (Katchalshi-katzir; Kraemer, 2000). A técnica de imobilização enzimática visa transformar enzimas solúveis em biocatalisadores insolúveis, considerando o meio onde se encontram substratos e produtos (Sheldon; Pelt, 2013), superando as limitações do emprego de enzimas solúveis (Dos Santos *et al.*, 2015).

Os principais desafios no emprego de lipases solúveis incluem as etapas de purificação para separar a enzima do produto, o que gera maior probabilidade de contaminação do produto desejado, e a impossibilidade de serem recuperadas do meio reacional na forma ativa para reuso, resultando em um biocatalisador com tempo de meia-vida operacional curto, o que reflete em um processo de custo elevado (Sheldon; Pelt, 2013). Além disso, podem não ser suficientemente estáveis dentro do reator. A imobilização enzimática é uma estratégia que pode solucionar as desvantagens do emprego de enzimas solúveis (Dos Santos *et al.*, 2015).

Em comparação com as enzimas solúveis, as enzimas imobilizadas (biocatalisadores heterogêneos) podem ser facilmente recuperadas do meio reacional e reutilizadas, isto reflete nos custos totais de produção, tornando o processo economicamente mais vantajoso (Sheldon; Pelt, 2013). Além da possibilidade de conduzir processos reacionais contínuos (sistema com alimentação de substratos e saída de produtos constantes) (Zhang *et al.*, 2022; Guajardo; Ahumada; De María, 2020) ou em fluxo (o mesmo biocatalisador participando de várias etapas reacionais) (Zou *et al.*, 2025). Adicionalmente, a imobilização enzimática pode proporcionar a melhoria de propriedades, em função dos fenômenos de superfície que ocorrem durante o processo de imobilização, como a atividade e estabilidade melhoradas dos biocatalisadores (Cipolatti *et al.*, 2019).

Em geral, as lipases imobilizadas são mais resistentes a mudanças do ambiente reacional, incluindo influências de temperatura, pH e solventes orgânicos (Sheldon; Pelt, 2013). As mudanças no desempenho da enzima imobilizada podem estar relacionadas à modificação

da estrutura da enzima (devido à interação química e física com o suporte), à geração de um ambiente reacional mais favorável no entorno das enzimas (devido à interação do suporte com os reagentes e solventes), à existência de limitações difusionais (modificando gradientes de concentração ao longo dos poros), entre outros fatores (Rodrigues *et al.*, 2013; Stepankova *et al.*, 2013; Verma; Barrow; Puri, 2013). Dessa forma, a imobilização enzimática tem demonstrado ser uma técnica muito promissora para tornar competitiva a aplicação de enzimas em larga escala (Resende *et al.*, 2017).

Contudo, a imobilização também pode causar a inativação da enzima e as limitações de transferência de massa podem causar uma diminuição na atividade do biocatalisador. Muitos fatores podem afetar o processo de imobilização do biocatalisador, incluindo pH, temperatura, tempo de imobilização, força iônica do meio, velocidade de agitação do meio, tipo de solventes, composição química e morfologia do suporte, tipo de interação entre a enzima e o suporte, precipitação de produtos, entre muitos outros. Esses parâmetros afetam a conformação da enzima e a taxa de transferência de massa de substratos e produtos, exercendo forte influência no procedimento de imobilização e desempenho final da enzima imobilizada (Fé *et al.*, 2024; Cipolatti *et al.*, 2019; Cunha *et al.*, 2014; Sheldon; Pelt, 2013; Tischer; Kascher, 1999).

Geralmente, os meios reacionais com baixa força iônica favorecem a adsorção de lipases a suportes hidrofóbicos e permitem a adsorção preferencial de lipases em comparação à demais proteínas presentes em um extrato proteico (Pito, 2017; Manoel *et al.*, 2015; Bastida *et al.*, 1998; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998). Manoel *et al.* (2015) propuseram que a atividade de biocatalisadores diminui com o aumento da concentração do tampão do meio. A alta força iônica favorece a conformação fechada das enzimas, promovendo uma adsorção mais lenta das lipases em suportes hidrofóbicos (Rodrigues *et al.*, 2019). Além disso, a quantidade de enzima oferecida para a imobilização é uma característica muito importante também, pois enzimas ofertadas em excesso podem formar sucessivas camadas de enzima no suporte, obstruindo os sítios ativos enzimáticos deixando-os indisponíveis para os substratos (Fé *et al.*, 2024; Kristensen; Xu; Mu, 2005). A imobilização adequada de enzimas e na forma ativa são desafios associados à imobilização enzimática que podem ser superados por meio da modulação dos aspectos anteriormente citados.

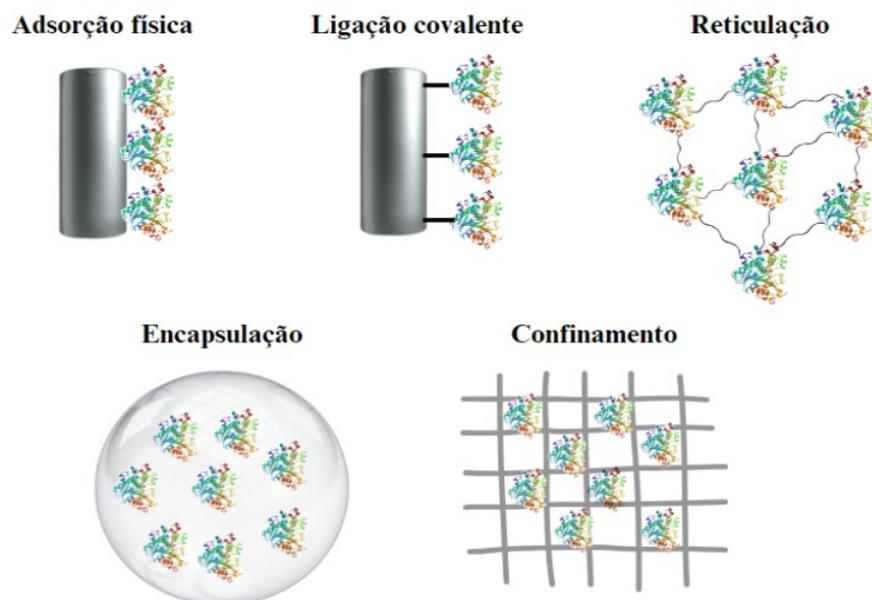
É importante ressaltar que não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas. Deve-se considerar as diferentes características físico-químicas de cada enzima e suporte, às diferentes propriedades dos substratos e produtos e as

diversificadas aplicações dos produtos obtidos. Além disso, todos os métodos de imobilização apresentam vantagens e limitações. Com isso, as condições ótimas de imobilização para uma determinada enzima são determinadas empiricamente (processo de erro e acerto), a fim de se obter maior retenção da atividade enzimática, estabilidade operacional e reuso (Resende *et al.*, 2017).

2.6.1 Métodos de imobilização enzimática

As enzimas, tais como as lipases, podem ser imobilizadas por diferentes métodos (Cipolatti *et al.*, 2019; Resende *et al.*, 2017). A Figura 6 ilustra esquematicamente as principais técnicas de imobilização enzimática. A Tabela 1 apresenta a definição e principais vantagens e desvantagens das principais técnicas de imobilização.

Figura 6 - Principais métodos de imobilização de enzimas



Nota: A imagem ilustra uma ligação covalente unipontual entre o suporte e a enzima com fins didáticos, porém é importante ressaltar que a ligação covalente é, geralmente, multiponto, interações do suporte com diferentes grupos funcionais na superfície da lipase.

Fonte: A autora, 2025.

Tabela 1 - Definição, vantagens e desvantagens dos principais métodos de imobilização enzimática

Método	Definição	Vantagens	Desvantagens
<i>Adsorção</i>	Adsorção da enzima à superfície de um suporte sólido através de ligações de <i>Van der Waals</i> ou interações hidrofóbicas	Preparo simples, baixa mudança estrutural das enzimas e baixo custo	Fácil dessorção em comparação aos demais métodos e aleatoriedade da interação enzima-suporte
<i>Ligação covalente</i>	Ligações covalentes de grupo funcionais específicos entre a superfície dos suportes e das enzimas	Forte ligação entre a enzima e o suporte e não possibilidade de dessorção	Exige suportes com grupos funcionais específicos, necessidade de pré-ativação dos grupos funcionais, preparo mais complexo e de maior custo e maior possibilidade de alteração em sua conformação nativa
<i>Confinamento/Encapsulação</i>	Aprisionamento da enzima em matriz polimérica ou em microcápsulas	Baixa alteração estrutural da enzima e proteção contra o contato direto com o meio reacional, evitando a desnaturação, e fácil preparo	Difícil controle do tamanho de poros do suporte, possível dessorção da lipase devido aos diferentes tamanhos de poros, limitações de transferência de massa e difusão dos substratos pelos poros da matriz com tamanhos inadequados
<i>Reticulação</i>	Ligações cruzadas em uma matriz contendo as enzimas e vários agentes bifuncionais	Baixo custo associado a não utilização de suportes	Dificuldade de reuso dos biocatalisadores. Em algumas técnicas, há a necessidade do uso da enzima pura.

Fonte: Segundo Fernández-Fernández; Sanromán; Moldes, 2013.

O método empregado nesta Dissertação foi a imobilização por adsorção, que se destaca por ser um método relativamente simples de executar e de baixo custo, o que reflete na redução dos custos totais de produção (Fé *et al.*, 2024; Ribeiro *et al.*, 2022; Pinto *et al.*, 2020a). Neste, as lipases são imobilizadas em um suporte hidrofóbico por meio de interações hidrofóbicas e eletrostáticas, principalmente por forças de Van der Waals (Zheng *et al.*, 2012a; Zhou *et al.*, 2012). Alguns estudos sugerem que suportes hidrofóbicos favorecem a redução da lixiviação e melhoria da atividade enzimática (provavelmente em função da maior exposição do sítio ativo da lipase) (Resende *et al.*, 2017, Mateo *et al.*, 2007; Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Balcão; Paiva; Malcata, 1996).

As vantagens da técnica incluem ainda; fácil execução, não necessidade de etapas complexas de pré-tratamento ou modificação química do suporte, resulta em pequenas modificações na conformação da lipase, pois a imobilização é espontânea, com isso a lipase adsorve em uma orientação energeticamente favorável, e é possível regenerar o suporte após o uso (Cipolatti *et al.*, 2019). Como desvantagens, apresenta a aleatoriedade da interação lipase-suporte e possibilidade de dessorção da lipase, em comparação às demais técnicas. Dentre as estratégias desenvolvidas a fim de minimizar a possibilidade de dessorção da enzima, estão a introdução de grupos funcionais no suporte que favoreçam a interação com a enzima, o pré-tratamento dos suportes visando melhorar a difusão da solução enzimática, a redução do tamanho de poros, a imobilização das lipases no interior dos poros, dentre outras estratégias (Ribeiro *et al.*, 2022; Cipolatti *et al.*, 2019).

Cao *et al.* (2020) realizaram um estudo sobre diferentes formas de imobilização de lipase de *Candida rugosa* em microesferas magnéticas de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) e magnetita modificada com ácido oleico, preparadas por suspensão aquosa. A lipase livre apresentou maior atividade (2,58 U/mg), seguida pela lipase adsorvida (2,20 U/mg), posteriormente pela lipase reticulada com polietilenoimina (2,14 U/mg), seguida pelos agregados de lipase reticulados (1,57 U/mg) e por fim, as lipases imobilizadas covalentemente (0,82 U/mg). A atividade de uma enzima está intimamente relacionada à sua conformação. No entanto, é inevitável interferir parcial ou totalmente, na conformação nativa da enzima no processo de imobilização, pois interações entre a enzima e o transportador frequentemente geram efeito sob a estrutura da enzima (Cao *et al.*, 2020).

2.7 Características gerais dos suportes

Existem diferentes materiais que podem ser aplicados como suportes para a imobilização de enzimas. A escolha de um suporte adequado para o tipo de lipase e a finalidade do biocatalisador são etapas que precisam ser avaliadas adequadamente para um melhor desempenho biocatalítico. Existem requisitos básicos para que um material seja considerado

um suporte adequado. Cada lipase, tipo de imobilização e emprego do biocatalisador exigem que o suporte apresente determinada característica (Pinto, 2017; Pinto; Freire; Pinto, 2014).

De modo geral, pode-se mencionar: insolubilidade no meio de reação (o suporte pode ser hidrofílico ou hidrofóbico); estabilidade mecânica; resistência química; elevada área específica (permite maior carga enzimática imobilizada); porosidade com diâmetro médio de poros adequado (permite que a lipase e o substrato difundam para a região interna do suporte); diâmetro de partículas; boa interação enzima-suporte; permeabilidade; capacidade de regeneração; baixo custo; resistência ao ataque microbiano e possibilidade de interações não específicas substrato-suporte. Considerando a imobilização por ligação covalente em particular, o suporte deve apresentar também elevada densidade de grupamentos reativos em sua superfície e espaçadores (como o glutaraldeído, por exemplo) podem ser usados entre a lipase e o suporte para aumentar a mobilidade da enzima e, conseqüentemente, sua atividade (Pinto, 2017; Datta *et al.*, 2013; Cao, 2005).

2.7.1 Tipos de suportes para imobilização de enzimas

De acordo com a sua morfologia, os suportes podem ser classificados como porosos, não porosos ou de estrutura em gel. Os materiais porosos destacam-se por apresentarem elevada área específica interna disponível para a imobilização de enzimas. É importante ressaltar que o diâmetro dos poros deve ser adequado para acomodar a enzima e permitir o acesso do substrato. Como desvantagem, os suportes porosos podem apresentar limitações difusionais, uma vez que o substrato deve difundir da solução para a superfície externa e para o interior dos poros do suporte, onde grande parte das moléculas do biocatalisador está situada. Contudo, o tamanho dos poros dos suportes pode ser facilmente ajustado por diferentes técnicas de preparação. Além disso, a imobilização das enzimas no interior dos poros pode conferir proteção frente a eventuais condições adversas do meio reacional (Ribeiro *et al.*, 2022; Resende, 2017).

Os suportes também podem ser classificados quanto a sua escala de tamanho. Geralmente, as nanopartículas compreendem de 1 a 100 nm (Mishra *et al.*, 2018) e as micropartículas de 1 a 1000 μm (Verma *et al.*, 2021). O uso de matrizes de pequeno porte como suporte para imobilização permite maximizar a área específica possibilitando maior carga enzimática imobilizada e reduzindo as limitações de difusão. As nanopartículas, geralmente, apresentam como vantagens maior área específica e como desvantagens o fenômeno de agregação e um maior custo associado (Zhong *et al.*, 2020; Cipolatti *et al.*, 2016). Em contraste, o uso de materiais de tamanho micro para imobilização de enzimas, leva a biocatalisadores mais homogêneos em função da agregação nula ou muito baixa das partículas, o que facilita o manuseio e a recuperação (Del Arco *et al.*, 2021).

Quanto à origem dos suportes, podem ser classificados como materiais orgânicos ou inorgânicos. Os materiais inorgânicos, como sílica, zeólitas, magnetita e grafeno, por exemplo, são frequentemente estáveis térmica, mecânica e quimicamente, não tóxicos e resistentes a ataques microbianos. Os materiais orgânicos, como os polímeros naturais - quitina, agarose, quitosana, gelatina, dextrana e celulose - e os polímeros sintéticos - poli(acrilamida, poli (álcool vinílico), poliestireno, entre outros - também têm sido empregados como suportes para imobilização de enzimas (Cipolatti *et al.*, 2019).

Os polímeros orgânicos sintéticos se destacam como suportes para a imobilização de enzimas principalmente pela possibilidade de manipulação das características do suporte como, composição, área específica, diâmetro e volume de poros, distribuição do tamanho de partículas e funcionalidade da superfície, permitindo interações específicas entre a enzima e o suporte. Assim, suportes poliméricos sintéticos apresentando propriedades distintas podem ser preparados com as características necessárias para cada tipo de enzima, técnica de imobilização e emprego do biocatalisador, resultando em biocatalisadores com desempenho melhorado. Além disso, podem ser sintetizados por meio de técnicas de simples execução com a possibilidade de custos baixos (Cipolatti *et al.*, 2019; Pinto; Freire; Pinto, 2014).

As nanopartículas magnéticas (NPMs) têm recebido destaque como suportes para imobilização de enzimas em virtude de sua característica superparamagnética, que permite que os biocatalisadores sejam facilmente recuperados magneticamente e reutilizados na ausência de campo magnético, dispensando etapas de centrifugação ou filtração para separar os biocatalisadores do produto (Silva *et al.*, 2024; Cipolatti *et al.*, 2016). Porém, o emprego de NPMs para imobilização enzimática apresenta desvantagens, como a tendência de agregação

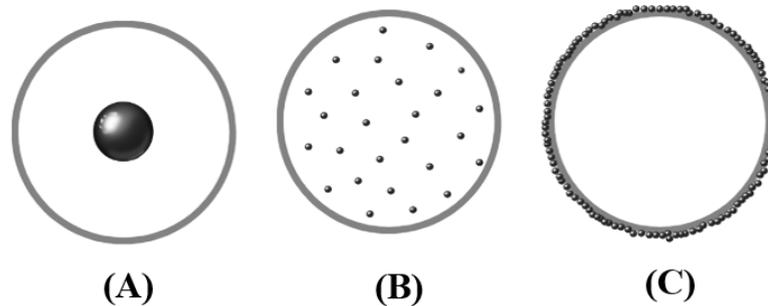
das nanopartículas (mesmo após a modificação da superfície) que resulta em redução da área específica do material e afeta a carga enzimática adsorvida na imobilização e o desempenho do biocatalisador (Cipolatti *et al.*, 2016).

A incorporação de NPMs em matrizes poliméricas é uma estratégia que reduz os efeitos indesejados de agregação das nanopartículas. O emprego de polímeros sintéticos como matriz para a incorporação de NPMs resulta suportes para a imobilização enzimática que podem combinar a propriedade superparamagnética das NPMs à possibilidade de modelagem das características texturais dos polímeros sintéticos, como a morfologia, o tamanho dos poros, a área específica, o tamanho das partículas, entre outras. Com isso, possibilitando o desenvolvimento de um suporte magnético específico para cada tipo de enzima e aplicação desejada, conforme mostra a literatura (Melo *et al.*, 2024; Tan *et al.*, 2022; Afzal *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2017).

2.8 Suportes poliméricos magnéticos

Existem diferentes morfologias para suportes poliméricos magnéticos. Philippova *et al.* (2011) propuseram três morfologias para os materiais esféricos poliméricos magnéticos. A morfologia núcleo magnético e casca polimérica, a morfologia núcleo polimérico e casca magnética e a morfologia matriz polimérica com o material magnético incorporado e distribuído de forma homogênea. A Figura 7 ilustra as morfologias para microesferas poliméricas magnéticas. Para esta Dissertação, a morfologia de interesse é a de polímeros esféricos com partículas de magnetita distribuídas na matriz polimérica, pois pode ser facilmente obtida em uma etapa através da técnica de polimerização por suspensão (Silva *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2017).

Figura 7 – Morfologias para microesferas magnéticas



Legenda: (A) Núcleo magnético - Casca polimérica, (B) partículas magnéticas distribuídas homogeneamente na esfera polimérica e (C) Núcleo polimérico - casca magnética.

Fonte: Adaptado de Philippova *et al.*, 2011.

2.8.1 Polimerização em suspensão

Por ser a técnica empregada nesta Dissertação, a polimerização em suspensão será discutida. Esta técnica é classicamente empregada para a preparação de partículas poliméricas esféricas de tamanho micrométrico (Vivaldo-Lima *et al.*, 1997; Yuan; Kalfas; Ray, 1991), além de copolímeros esféricos porosos com uma ampla distribuição de tamanho de partícula (Okay, 2000). Esta técnica produz partículas polidispersas como resultado dos fenômenos de quebra e coalescência das gotas monoméricas durante a polimerização (Dowding; Vincent, 2000; Kalfas; Yuan; Ray, 1993). O tipo de monômero utilizado, a velocidade de agitação do sistema, o formato e o tamanho do reator, a viscosidade da fase contínua, a concentração e o tipo de agente de suspensão usado, são fatores que afetam a distribuição de tamanho das partículas poliméricas (Castanharo, 2015; Dowding; Vincent, 2000).

A polimerização em suspensão consiste, basicamente, na dispersão de uma fase orgânica em uma fase aquosa (contínua). A fase orgânica compreende um ou mais monômeros, além de iniciador e do diluente inerte solúvel na mistura de monômeros e insolúveis na fase contínua. A fase contínua (comumente chamada de fase aquosa), contém aditivos que favorecem a formação das esferas poliméricas. Vários sais podem ser adicionados à fase aquosa

a fim de diminuir a solubilidade em água dos monômeros (efeito *salting out*). A presença de cloreto de sódio (NaCl) na fase aquosa reduz a solubilidade dos monômeros e favorece, assim, a formação de partículas esféricas (Okay, 2000).

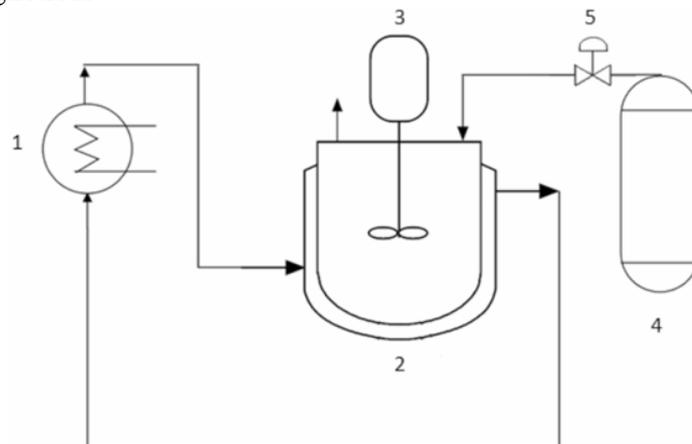
A fase descontínua (comumente chamada de orgânica) é adicionada à fase aquosa sob agitação, de modo que se distribua na forma de gotículas dentro da fase contínua. Ocorrem reações de polimerização e reticulação em cada gotícula de monômero-diluyente. Ao longo da reação as gotículas monoméricas adquirem progressivamente alta viscosidade até que resulta na formação de esferas poliméricas (Okay, 2000). Algumas literaturas descrevem a polimerização em suspensão como um conjunto de microrreatores, no qual cada gota monomérica corresponde a um microrreator de polimerização em massa (Machado; Lima; Pinto, 2007; Arshady, 1992).

É importante mencionar que além dos sais, a fase aquosa também pode conter agentes de suspensão ou estabilizantes que promovem a diminuição da tensão interfacial entre a fase orgânica e a fase aquosa melhorando a estabilidade das gotas monoméricas ao longo da reação (Dowding; Vincent, 2000). Com isso, diminuem a aglomeração das partículas parcialmente polimerizadas, que apresentam aspecto pegajoso, durante a reação, pois formam um filme protetor ao redor das gotículas de monômero (Vivaldo-Lima *et al.*, 1997; Kalfas; Yuan; Ray, 1993). O poli(álcool vinílico) (PVA) destaca-se como um dos agentes de suspensão mais empregados em polimerização em suspensão (Castanharo, 2015).

A polimerização em suspensão possui importantes vantagens em comparação às demais técnicas de polimerização. Possui maior taxa de reação quando comparada à polimerização em solução, devido aos monômeros concentrados em cada gotícula. As partículas poliméricas podem ser mais facilmente separadas do meio reacional, por sedimentação ou filtração, em comparação à polimerização em emulsão que, por sua vez, emprega agentes coagulantes que aumentam o risco de impurezas no produto, o que reflete nos custos de separação do polímero. Em comparação às polimerizações em solução e em massa, a menor viscosidade do meio reacional permite que o sistema seja mais facilmente manipulado e possibilita a obtenção de suspensões mais homogêneas, sendo assim, mais eficiente no controle e na remoção de calor ao longo da reação (Machado; Lima; Pinto, 2007; Yuan; Kalfas; Ray, 1991).

Como desvantagens, pode-se mencionar a possibilidade de aderência do material polimérico nas paredes e partes internas dos reatores, o que gera uma limitação para a implementação a nível comercial de reatores contínuos. Além disso, em geral, o rendimento de polimerização é mais baixo em comparação a polimerização em emulsão. E a presença de água promove menor produtividade em comparação a polimerização em massa conduzida em reatores de mesma capacidade (Lourenço-Neto, 2024; Yuan; Kalfas; Ray, 1991). A Figura 8 mostra um esquema do sistema experimental utilizado na síntese de partículas de PS-DVB magnéticas.

Figura 8 - Sistema experimental utilizado na síntese de partículas de PS-DVB magnéticas



Legenda: 1- Banho termostático; 2- reator de vidro revestido; 3 - agitador mecânico; 4 – cilindro de gás N_2 e 5 – válvula de controle de pressão.

Fonte: Adaptado de Silva *et al.*, 2018.

2.8.1.1 Tipos de polimerização em suspensão

A maneira com que a polimerização em suspensão é conduzida afeta significativamente a cinética da reação, a morfologia e a homogeneidade das partículas sintetizadas. Existem diferentes formas de executar a técnica, incluindo a polimerização tipo

pérola, a polimerização tipo granular (o polímero é insolúvel na fase orgânica, precipitando no interior de cada gota monomérica), a polimerização inversa (o monômero hidrofílico é disperso em uma fase contínua orgânica), a polimerização em microssuspensão (a agitação vigorosa e a adição de agentes estabilizantes geram partículas poliméricas muito pequenas) e a polimerização em semissuspensão (primeiramente ocorre uma polimerização em massa, até determinada conversão; e depois, a fase orgânica pré-polimerizada é transferida para outro reator, onde é conduzida uma reação em suspensão) (Lourenço-Neto, 2024; Castanharo, 2015; Machado; Lima; Pinto, 2007; Dowding; Vincent, 2000).

Na presente Dissertação, foi empregada uma adaptação da técnica de semissuspensão aquosa, que consiste em uma pré-polimerização da fase orgânica e posterior adição da fase aquosa no mesmo reator. Esta técnica permite que a magnetita, adicionado à fase orgânica para a preparação de polímeros magnéticos, seja melhor incorporado à matriz polimérica. A maior vantagem desta adaptação é que não transferir a fase orgânica para outro reator contendo a fase aquosa possibilita menor perda de material polimérico e melhora o rendimento de polimerização. Esta técnica foi empregada na presente Dissertação objetivando que a pré-polimerização da fase orgânica diminua a taxa de transferência da magnetita para a fase aquosa, com a qual possui maior afinidade físico-química, possibilitando o preparo de polímeros com magnetita mais bem distribuída na matriz polimérica, conforme metodologia empregada por outros trabalhos na literatura (Lourenço-Neto, 2024; Silva *et al.*, 2022; Castanharo *et al.*, 2015; Formiga *et al.*, 2013). De modo geral, a polimerização por semissuspensão aquosa permite o preparo de esferas poliméricas porosas de diferentes escalas de tamanho com boa reprodutibilidade (Castanharo, 2015) e boa incorporação da magnetita à matriz polimérica (Lourenço-Neto, 2024).

2.8.1.2 Efeito do diluente

O efeito do diluente na polimerização será discutido nesta Dissertação uma vez que se almeja preparar suportes poliméricos magnéticos com diferentes estruturas para a

imobilização de enzimas. Vários diluentes ou misturas de diluentes podem ser utilizados para a preparação de partículas poliméricas com diferentes porosidades (Okay, 2000). Em geral, diluentes com maior capacidade para solvatar as cadeias poliméricas em crescimento tendem a resultar em polímeros com baixo volume de poros e alta área específica (polímeros microporosos), ao passo que diluentes com menor capacidade de solvatação ou diluentes não solvantes tendem a formar polímeros com alto volume de poros e menor área específica (polímeros macroporosos) (Gokmen; Du Prez, 2012; Sherrington, 1998).

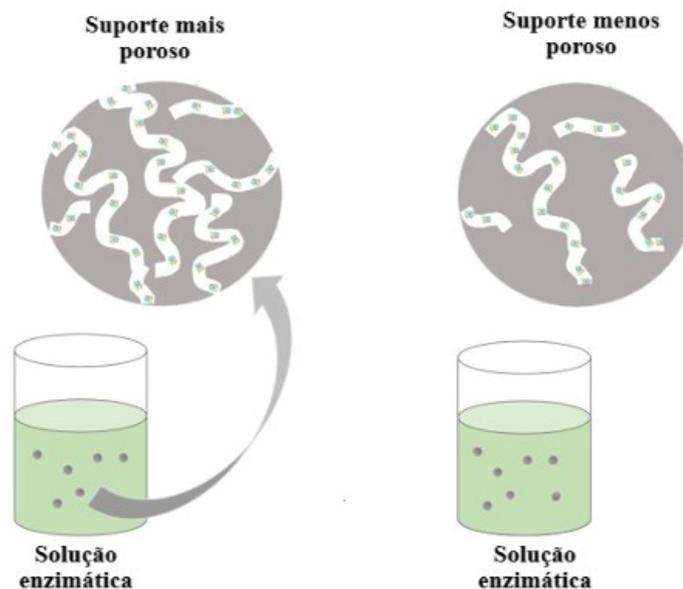
De modo geral, diluentes com boa capacidade de solvatação interagem com as cadeias poliméricas em crescimento mantendo-as inchadas até a precipitação do polímero com as cadeias poliméricas expandidas, resultando em uma estrutura porosa com poros de baixo volume. Ao passo que, diluentes com baixa capacidade de solvatação promovem a formação de pequenos núcleos poliméricos que se ligam uns aos outros por ligações cruzadas formando aglomerados que precipitam. Os diluentes se acomodam nos espaços vazios entre os aglomerados e ao serem retirados ao final da síntese, geram resinas com poros de alto volume (Hao, 2009; Okay, 2000).

O grau de diluição dos monômeros no diluente é um parâmetro importante para o controle da porosidade dos polímeros. De modo geral, quanto maior a diluição dos monômeros no diluente, maior a porosidade dos materiais poliméricos. Rabelo (1993) demonstrou que, na síntese de microesferas de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) via polimerização em suspensão com *n*-heptano como diluente não solvante, um aumento no grau de diluição dos monômeros no diluente, promoveu um aumento na porosidade das microesferas (Rabelo; Coutinho; 1994a; Rabelo; Coutinho, 1994b; Rabelo, 1993).

Em geral, a estrutura porosa dos suportes poliméricos desempenha um papel fundamental para a imobilização de enzimas, pois os parâmetros de imobilização e o desempenho dos biocatalisadores estão intimamente relacionados com as características morfológicas dos suportes (Ribeiro *et al.*, 2022; Pinto *et al.*, 2020a; Cunha *et al.*, 2014). Cunha *et al.* (2014) prepararam biocatalisadores à base de CALB imobilizada em suportes núcleo/casca PS-*co*-DVB/ PS-*co*-DVB com diferentes áreas específicas e diâmetros de poros e observaram que a área específica teve maior influência na atividade hidrolítica dos biocatalisadores do que o diâmetro dos poros.

Contudo, Ribeiro *et al.* (2022) prepararam biocatalisadores à base de CALB imobilizada em suportes de PS-DVB com diferentes estruturas porosas e demonstraram que o diâmetro dos poros foi mais influente para os valores de rendimento de imobilização do que a área específica. Explicaram que diâmetros de poro maiores podem favorecer o acesso da solução enzimática na estrutura porosa interna das partículas de suporte. A Figura 9 ilustra a relação da porosidade dos suportes com o acesso da solução enzimática. Wang *et al.* (2024) mostrou que a imobilização das enzimas dentro dos poros pode servir como uma barreira protetora, protegendo a enzima de condições ambientais adversas, incluindo altas temperaturas e níveis de pH variáveis do meio reacional. Esse efeito protetor pode minimizar as mudanças conformacionais na estrutura da enzima, permitindo que a enzima imobilizada mantenha sua atividade sob diversas condições (Wang *et al.*, 2024).

Figura 9 - Relação da porosidade dos suportes com o acesso da solução enzimática



Fonte: Adaptado de Ribeiro *et al.*, 2022.

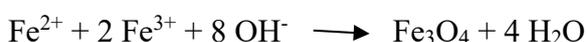
Existe um consenso na literatura de que as características morfológicas dos suportes poliméricos podem afetar as propriedades catalíticas dos biocatalisadores derivados, incluindo estabilidade, atividade e especificidade (Pinto *et al.*, 2020a; Pinto; Freire; Pinto, 2014; Graebin *et al.*, 2012; Fernandez-Lafuente *et al.*, 2008). Partículas de copolímero de

estireno/divinilbenzeno com estruturas porosas obtidas por polimerização em suspensão aquosa podem ser boas candidatas para suportar enzimas. O interesse em tais polímeros pode ser explicado pela simplicidade da técnica de polimerização, o baixo custo dos monômeros e a possibilidade de preparar partículas com diferentes propriedades (distribuição de tamanho, área específica, volume e diâmetro de poros) (Ribeiro *et al.*, 2022).

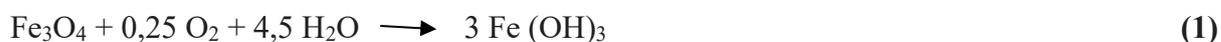
2.8.2 Preparo da magnetita por coprecipitação

O método de coprecipitação será discutido nesta Dissertação, pois foi a técnica escolhida para o preparo da magnetita. A coprecipitação é o método mais empregado para a preparação de materiais magnéticos para a imobilização de enzimas (Cavalcante *et al.*, 2024), pois apresenta como vantagens, simples preparação e baixo custo. Na literatura, estudos demonstram que os materiais magnéticos preparados a partir desta técnica apresentam característica superparamagnética adequada para o emprego em imobilização enzimática (Melo *et al.*, 2024; Liu *et al.*, 2022; Farhan *et al.*, 2021; Dal Magro *et al.*, 2018).

De modo geral, os precursores consistem em uma solução de sais de Fe^{3+} e outra de sais de metal divalente desejado (M^{2+}), os mais usados são Fe, Co, Ni, Cd, Mn e Zn. Os sais de ferro podem ser cloretos, sulfatos, nitratos, acetoacetato, entre outros, enquanto o agente precipitante é uma base como NH_4OH , NaOH ou KOH (Al-Madhagi *et al.*, 2023). O mecanismo de síntese envolve a mistura das soluções de sais seguida de adição da solução alcalina; sob agitação vigorosa, atmosfera inerte e temperatura moderada; promovendo a reação de oxirredução que ocorre ao reagir íons férricos e ferrosos com os grupos hidroxila da base. O meio alcalino é fundamental para a formação de magnetita (Fe_3O_4) (Hui; Salimi, 2020), conforme a reação:



Os cloretos férricos (FeCl_3) e ferrosos (FeCl_2) com hidróxido de amônio (NH_4OH) são extensamente usados para a síntese de magnetita. A magnetita é relativamente instável. O calor excessivo e o oxigênio atmosférico podem favorecer a conversão de magnetita (Fe_3O_4 , cor preta) em maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$, cor marrom). A maghemita, por sua vez, possui comportamento magnético inferior à magnetita, e por isso, algumas estratégias são descritas na literatura para minimizar esta conversão. O sistema livre de oxigênio e a temperatura moderada são parâmetros importantes para evitar a oxidação da magnetita durante a síntese (Lavorato *et al.*, 2023), conforme as seguintes reações:



A atmosfera inerte pode ser alcançada pela passagem de N_2 no sistema reacional (Castanharo *et al.*, 2015). A agitação vigorosa garante a mistura dos sais e a não aderência de magnetita precipitado no reator, facilitando sua transferência e armazenamento (Lourenço-Neto, 2024).

Após a síntese, a lavagem e o armazenamento são etapas importantes para o melhor desempenho do material. Estudos demonstram que o pH baixo e a lavagem com água favorecem a agregação das nanopartículas, o que por sua vez tem um impacto significativamente negativo nas propriedades magnéticas. A lavagem de magnetita com etanol pode aumentar a dispersão e a resposta magnética (Abdullah *et al.*, 2023). Por este motivo, alguns trabalhos empregam a lavagem com etanol, seguida da adição de poucas gotas de ácido clorídrico (HCl) objetivando diminuir o pH do meio para reduzir a agregação das nanopartículas (Castanharo *et al.*, 2015). O armazenamento pode ser feito sob atmosfera inerte e protegido da luz para a manutenção da integridade do material (Silva *et al.*, 2022; Castanharo *et al.*, 2015).

Vale ressaltar também, que a técnica de coprecipitação empregando cloretos férricos (FeCl_3) e ferrosos (FeCl_2) com hidróxido de amônio (NH_4OH) como reagentes, gera como produto um material magnético constituído por uma mistura de óxidos de ferro. A magnetita (Fe_3O_4), em geral, é o componente com maior característica magnética, e por isso, muitos trabalhos assumem o produto de coprecipitação exclusivamente como magnetita. Porém, além

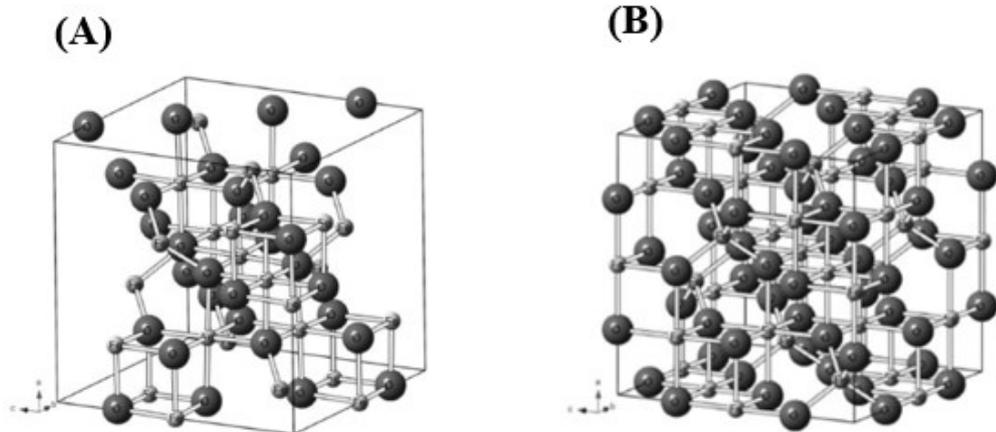
desta, o material é constituído também por; maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), goetita ($\alpha\text{-FeOOH}$) (que não possui característica magnética) e traços de outros óxidos de ferro (Silva *et al.*, 2022).

2.8.2.1 Estrutura cristalina e propriedade superparamagnética

As nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) são as mais empregadas para imobilização enzimática (Cavalcanti *et al.*, 2022), devido a sua relação custo-benefício, biocompatibilidade, baixa toxicidade, grande área de superfície, suscetibilidade magnética, alta magnetização de saturação, propriedade superparamagnética à temperatura ambiente e técnicas de preparo acessíveis (Cavalcante *et al.*, 2024; Navarro-López *et al.*, 2023; Cavalcanti *et al.*, 2022; Falciglia *et al.*, 2022). A estrutura da magnetita (Fe_3O_4) é composta por ferro em dois estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} , apresentando estrutura cúbica de espinélio invertido, com os íons O^{2-} coordenados aos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nos interstícios octaédricos e aos íons Fe^{3+} nos interstícios tetraédricos. Como os íons Fe^{3+} são dispostos igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas, não resultam em momento magnético. No entanto, os íons Fe^{2+} situam-se somente nos interstícios octaédricos, sendo estes, responsáveis pela característica magnética do material. É importante mencionar também, que os íons Fe^{2+} presentes nos sítios octaédricos na estrutura da magnetita podem ser facilmente oxidados (Oliveira; Fabris; Pereira, 2013).

A maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) também é um óxido de ferro muito empregado para a preparação de biocatalisadores magnéticos (Bilal *et al.*, 2019). Sua estrutura é semelhante à da magnetita (estrutura cúbica de espinélio invertido), porém apresentam somente os íons Fe^{3+} em sua estrutura, sendo esta a principal diferença (Lee; Lee, 2006). Os íons Fe^{3+} acomodam-se em interstícios octaédricos e tetraédricos da rede de oxigênio. Cada célula unitária (cúbica) de maghemita contém, em média, 32 íons O^{2-} ; 21,33 íons Fe^{3+} , distribuídos em 8 sítios tetraédricos e 16 octaédricos, e 2,66 vacâncias em sítios octaédricos (Oliveira; Fabris; Pereira, 2013; Figueiredo, 2009). A Figura 10 mostra a estrutura cristalina na magnetita e da maghemita.

Figura 10 - Estrutura cristalina da magnetita (A) e da maghemita (B)



Fonte: Adaptado de Oliveira; Fabris; Pereira, 2013.

As propriedades magnéticas de um material são determinadas de acordo com sua resposta fundamental a um campo magnético externo (momento magnético) por massa do material (Behzad; Chegel, 2024; Nguyen *et al.*, 2023; Vaghari *et al.*, 2016). O material superparamagnético se caracteriza por alta magnetização de saturação (M_s), com baixa coercividade (H_{ci}), capacidade do material magnético em resistir à desmagnetização, e baixa retentividade (M_r), habilidade do material magnético em manter uma parte da magnetização após a interrupção do estímulo magnetizante (Elamin *et al.*, 2023).

Em geral, este fenômeno ocorre quando o material magnético possui diâmetro entre 10 nm e 150 nm (Bedanta; Petravic; Kleemann, 2015; Neuerge *et al.*, 2005). Nestes nanomateriais, a histerese (tendência de um sistema de conservar as suas propriedades na ausência de novo estímulo) tende a zero e com isso, a desmagnetização ocorre mais prontamente (Peddis *et al.*, 2014; Petravic, 2010; Papaefthymiou, 2009). Este comportamento permite que os biocatalisadores magnéticos sejam separados do meio reacional pela aplicação de um campo magnético externo (Melo *et al.*, 2023) e uma vez que o campo magnético externo é removido não retêm suas propriedades magnéticas, o que é importante para a reutilização dos biocatalisadores (Esmi *et al.*, 2021; Armenia *et al.*, 2019; Cipolatti *et al.*, 2016).

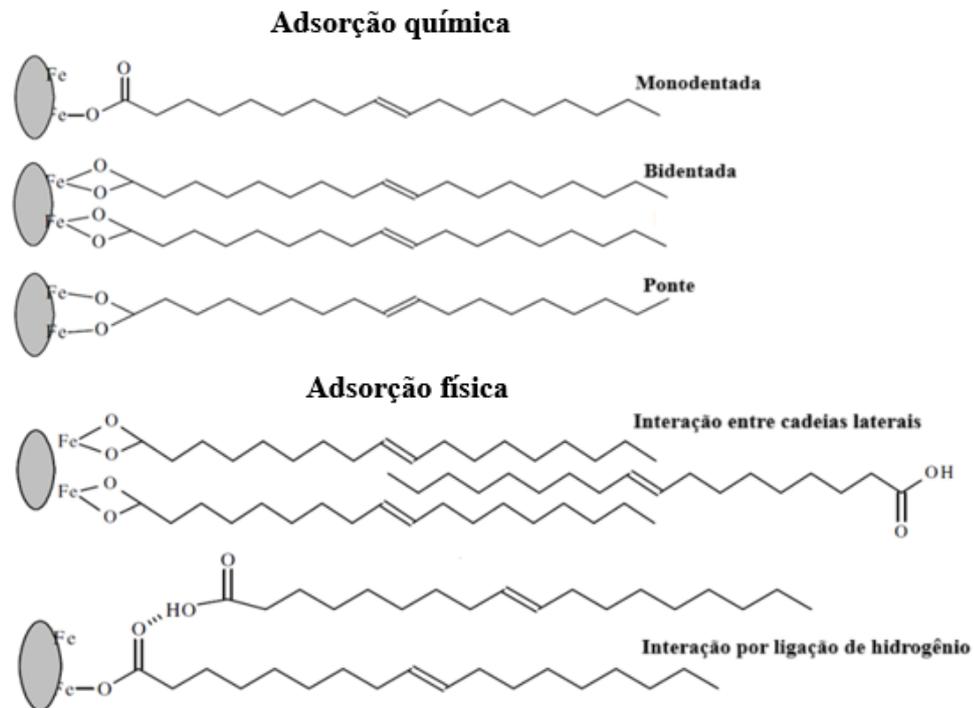
2.8.2.2 Estabilização de nanopartículas de magnetita

De modo geral, a alta área específica dos materiais nanométricos confere uma característica de agregação às nanopartículas, que pode resultar em diminuição de magnetismo e de dispersividade em função da redução da área interfacial (Egea-Benavente *et al.*, 2023). Por isso, algumas estratégias de modificação química e física da superfície de NPMs foram desenvolvidas, empregando diversos materiais, a fim de diminuir a agregação (Egea-Benavente *et al.*, 2023) e melhorar a estabilidade de nanopartículas magnéticas (Sadegui; Moghimifar; Javadian, 2023).

O ácido oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) é um dos compostos orgânicos mais empregados para a modificação de NPMs. Basicamente, o oleato, proveniente da desprotonação do grupo carboxílico do ácido oleico, coordena com os íons ferro presentes na superfície das nanopartículas. Sua cadeia carbônica melhora a lipofilicidade da superfície e impede que as nanopartículas se agreguem. Além disso, promove estabilidade química ao nanomaterial, uma vez que reduz a suscetibilidade à oxidação (Lobato; Mansur; Ferreira, 2017; Zhang; He; Gu, 2006). A eficiência da modificação e o baixo custo do ácido oleico, o torna uma excelente escolha para a estabilização de NPMs como suportes para imobilização de enzimas (Cao *et al.*, 2020; Meng *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2012).

A adsorção química do ácido oleico à superfície das NPMs pode ser por coordenação monodentada, bidentada ou em ponte. Além destas, o ácido oleico adsorve fisicamente às NPMs por meio de ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals entre as cadeias carbônicas dos ácidos oleicos quimissorvidos e as cadeias carbônicas das moléculas de ácido oleico livres no meio reacional. A adsorção física confere bicamadas de ácido oleico à superfície do nanomaterial (Vialli, 2009). A Figura 11 ilustra os possíveis modos de coordenação do oleato aos íons ferro da superfície das nanopartículas de magnetita.

Figura 11 - Ilustração dos possíveis modos de coordenação do oleato aos íons ferro da superfície das nanopartículas de óxido de ferro

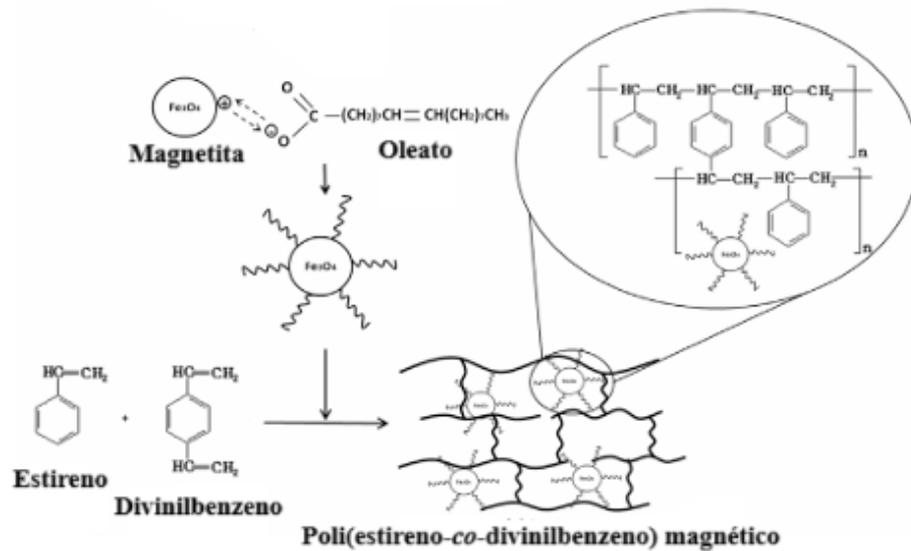


Fonte: Adaptado de Vialli, 2009.

A modificação na superfície das nanopartículas também pode favorecer a incorporação destes nanomateriais em matrizes poliméricas hidrofóbicas, como o poli(estireno-co-divinilbenzeno) (Silva *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2017; Formiga *et al.*, 2013). Uma vez que a superfície das NPMs é hidrofílica, a modificação de sua superfície pode permitir uma melhor interação com monômeros hidrofóbicos durante a polimerização (Reis; Souza; Batista, 2022). Vale mencionar que as propriedades magnéticas das nanopartículas podem ser reduzidas após modificação e imobilização da enzima (Parandi *et al.*, 2023; Navarro-López *et al.*, 2023).

Apesar disto, alguns trabalhos na literatura demonstram que, após a modificação da superfície e imobilização enzimática, os biocatalisadores, preparados a partir de enzimas imobilizadas em suportes poliméricos magnéticos, permanecem apresentando características magnéticas adequadas para a recuperação via campo magnético e posterior reuso do biocatalisador (Wang *et al.*, 2024; Tan *et al.*, 2022; Cao *et al.*, Afzal *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2017). A Figura 12 mostra o mecanismo de modificação e incorporação da magnetita à matriz polimérica.

Figura 12 - Mecanismo de modificação e incorporação da magnetita à matriz polimérica



Fonte: Adaptado de Bento *et al.*, 2017.

Muitos trabalhos na literatura já descreveram a preparação de biocatalisadores heterogêneos baseados em lipases imobilizadas em suportes de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (Torquato *et al.*, 2025; Fé *et al.*, 2024; Ribeiro *et al.*, 2022; Pinto *et al.*, 2020a; Pinto *et al.*, 2020b; Pinto *et al.*, 2018; Cipolatti *et al.*, 2018; Manoel *et al.*, 2016; Pinto; Freire; Pinto, 2014; Cunha *et al.*, 2014), no entanto, poucos estudos imobilizaram lipases em suportes de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnéticos (Silva *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2017) e não foram encontrados estudos investigando a relação entre as propriedades estruturais dos suportes de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnéticos com os parâmetros de imobilização e a eficiência catalítica dos biocatalisadores obtidos. A Tabela 2 mostra um panorama do estudo de lipases imobilizadas em suportes poliméricos sintéticos magnéticos nos últimos 10 anos.

Considerando os efeitos que o grau de diluição dos monômeros na polimerização pode exercer sobre a morfologia do suporte e as estruturas dos poros, esta investigação pode ser de importância significativa para a tecnologia de fabricação de biocatalisadores. Por isso, objetivando contribuir com o avanço científico dos biocatalisadores magnéticos, esta Dissertação propõem um estudo relacionando diferentes morfologias do suporte à base de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético, obtidas a partir da variação do grau de diluição em *n*-heptano, com os parâmetros de imobilização e o desempenho dos biocatalisadores.

Tabela 2 - Panorama do estudo de lipases imobilizadas em suportes poliméricos sintéticos magnéticos

Polímero sintético	Material magnético	Fonte da lipase	Tipo de imobilização	Aplicação	Referências
Poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno)	Fe ₃ O ₄ modificada com ácido oleico	<i>Candida antarctica</i> B	Adsorção	Síntese de ésteres etílicos a partir de ácidos graxos alifáticos	Presente Dissertação
Poli(ureia- <i>co</i> -uretano)	Fe ₃ O ₄ modificada com ácido oleico	<i>Candida antarctica</i> B	Adsorção e ligação covalente	-	Chiaradia <i>et al.</i> , 2016
Poli (N-isopropil acrilamida, acrilamida e alilamina)	Fe ₃ O ₄	<i>Candida antarctica</i> B	Adsorção	Nanomotores enzimáticos	Soleymani <i>et al.</i> , 2023
Poli (metacrilato de glicidil - <i>co</i> -ácido metacrílico)	Fe ₃ O ₄	<i>Candida rugosa</i>	Ligação covalente	Produção de biodiesel	Xie; Huang, 2020
Poli (acrilamida)	Fe ₃ O ₄	<i>Aspergillus oryzae</i> ST11	Reticulação (mCLEAs) usando glutaraldeído	Síntese de biodiesel	Paitaid; H-Kittikun, 2020
Poli(éter diglicidílico de bisfenol A)	Fe ₃ O ₄ revestida com polietilenoimina	Eversa® Lipase Transform 2.0	Ligação covalente	Esterificação dos ácidos graxos do óleo de babaçu	Melo <i>et al.</i> , 2024
Poli(metacrilato de glicidila)	Fe ₃ O ₄ revista com SiO ₂	<i>Candida antarctica</i> B	Ligação covalente	Síntese do acetato de etila	Afzal <i>et al.</i> , 2020
Poli(metacrilato de metila- <i>co</i> -divinilbenzeno)	Fe ₃ O ₄ modificada com ácido oleico	<i>Candida rugosa</i>	Adsorção, ligação covalente e reticulação com PEI	-	Cao <i>et al.</i> , 2020

Poli(metacrilato de glicidila- <i>co</i> -metacrilato de 2- etil dimetilamina)	Fe ₃ O ₄	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção e ligação covalente	-	Wang <i>et al.</i> , 2014
Poli(estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno)	Fe ₃ O ₄ modificada com ácido oleico	<i>Candida rugosa</i>	Adsorção	Síntese de <i>n</i> -butirato de butila	Bento <i>et al.</i> , 2017
Poli (o-toluidina)	Fe ₃ O ₄	<i>Candida rugosa</i>	Ligação covalente	Síntese de ésteres de sabor de frutas	Asma; Husain, 2019
Poli (dopamina)	ZnFe ₂ O ₄	<i>Rhizomucor miehei</i>	Reticulação	Síntese de 1,3-dioleoil-2-palmitoilglicerol	Huang <i>et al.</i> , 2023
Poli (dopamina- <i>co</i> -acrilamida)	Fe ₃ O ₄ modificada com (3-aminopropil)triétoxissilano	<i>Candida antarctica</i> A	Ligação covalente	Síntese de amido de anidrido octenil succínico	Tan <i>et al.</i> , 2022
Poli (estireno- <i>co</i> -divinilbenzeno)	Fe ₃ O ₄ modificada com ácido oleico	<i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Adsorção	Síntese de ésteres etílicos de ácidos graxos	Silva <i>et al.</i> , 2018

Nota: Para este levantamento de dados foram considerados artigos de procedimento experimental que preparam biocatalisadores a partir lipases imobilizadas em polímeros sintéticos combinados a um material magnético, nos últimos 10 anos.

Fonte: A autora, 2025.

3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

No presente item estão descritos os principais reagentes e enzima utilizados ao longo desta Dissertação, bem como sua procedência. Neste item também estão descritos os equipamentos utilizados.

3.1.1 Reagentes e procedências

Acetona P.A. (CH_3COCH_3) – Dinâmica Química Contemporânea Ltda, grau de pureza: 99,5%.

Acetonitrila ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) – Sigma Aldrich Ltda, grau de pureza: 99,8 %.

Ácido cáprico P.A. ($\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$) – Êxodo científica Ltda, grau de pureza: 99,5 %.

Ácido Clorídrico P.A. (HCl) – Qhemes Ltda, grau de pureza: 37 %.

Ácido esteárico P.A. ($\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$) – Êxodo científica Ltda, grau de pureza: 98 %.

Ácido láurico P.A. ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) – Êxodo científica Ltda, grau de pureza: 99 %.

Ácido mirístico P.A. ($\text{C}_{14}\text{H}_{28}\text{O}_2$) – Êxodo científica Ltda, grau de pureza: 98 %.

Ácido oleico P.A. (C₁₈H₃₄O₂) – B Herzog Ltda, grau de pureza: 98%.

Ácido palmítico P.A. (C₁₆H₃₂O₂) - Êxodo científica Ltda, grau de pureza: 99,5 %.

Álcool etílico P.A. – Tec Lab Ltda; grau de pureza: 99,5 %.

Álcool etílico – Rioquímica, grau de pureza: 70%.

Azobisisobutironitrila P.A. (AIBN) – Aldrich Chemical Company, Inc.

BSA (Proteína de Soro Bovino) – Sigma-Aldrich Ltda.

Cloreto de férrico P.A (FeCl₃ . 6 H₂O) – ISO FAR Ltda.

Cloreto de sódio (NaCl) P.A. – Vetec Química Fina Ltda.

Dimetilsulfóxido (DMSO) – Química Contemporânea Ltda, grau de pureza: 99,9 %

Divinilbenzeno P.A. (DVB) 55% – doado pela Nitriflex Indústria e Comércio Ltda.

Estireno P.A. (S) – doado pela Nitriflex Indústria e Comércio Ltda.

Fenoltaleína P.A. - Êxodo científica Ltda.

Fosfato de sódio monobásico P.A. – Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza: 99 %

Hidróxido de amônio P.A. (NH₄OH) – Qhemes Ltda grau de pureza: 98,9 %.

Hidróxido de sódio P.A. (NaOH) - Vetec Química Fina Ltda, grau de pureza: 99,5 %

Lipozyme® CALB - Novozymes Latin America Ltda.

***n*-heptano P.A. (C₇H₁₆)** – Aldrich Chemical Company, Inc.

Palmitato de *p*-nitrofenila (*p*-NFL) – Sigma Aldrich Ltda, grau de pureza: 98 %.

Poli (álcool vinílico) (PVA) – Kuraray Co. Ltd., Grau de Hidrólise: 87 %.

Reagente de Bradford – BioRad.

Sulfato ferroso (FeO₄ . 7 H₂O) – Sigma-Aldrich, grau de pureza: 99 %.

Triton-X – Sigma-Aldrich.

3.1.2 Equipamentos e materiais utilizados

Agitador magnético com aquecimento – IKA, mod. HS 7 (Laboratório de Química de Polímeros/ IQ/ UERJ).

Agitador mecânico – IKA Labortechnik, mod. RW-20M; munido de haste de agitação tipo meia lua (Laboratório de Química de Polímeros/ IQ/ UERJ).

Agitador tipo Roller – KASVI, mod. K45-8010 (Laboratório de Síntese Orgânica/ UERJZO).

Analizador de área específica e porosimetria (ASAP) – Micromeritics, mod. ASAP 2020 V3.01E (Laboratório de Caracterização Instrumental III/ IQ/ UERJ).

Analizador termogravimétrico (TG) – TA Instruments, mod. TGA Q.50 V6.4 Build 193 (Laboratório de Caracterização Instrumental I/ IQ/ UERJ).

Balança analítica digital – Bioprecisa, mod. FA2104N (Laboratório de Química de Polímeros/ IQ/ UERJ).

Banho termostático – Huber, mod. Polystat CC1 (Laboratório de Química de Polímeros/ IQ/ UERJ).

Difratômetro de Raios- x (XRD) – Bruker, mod. D8 Advance (Laboratório Multiusuário de Difração de Raios X/ IQ/ UERJ).

Espectrofotômetro - Jasco, mod. V-730bio (Laboratório de Biologia Microbiana de Fármacos/ UFRJ).

Espectrômetro de absorção na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) – Perkin Elmer, mod. Spectrum One (Laboratório de Caracterização Instrumental I / IQ/ UERJ).

Estufa – Icamo, mod. 3 (Laboratório de Química de Polímeros/ IQ/ UERJ).

Imã de neodímio - Com 48mm e força de atração de 80kg.

Incubadora – Novatecnica, mod. NT 712 (Laboratório de Química de Polímeros/ IQ/ UERJ).

Magnetômetro de amostra vibrante (VSM) – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia - Inmetro, Dimci/Diele/Lamat.

Metalizador – Denton vacuum desk V (Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura/ IQ/ UERJ).

Microscópio eletrônico de varredura – JEOL, mod. JSM 6510 LV (Laboratório Multiusuário de Nanofabricação e Caracterização de Nanomateriais/ FEN/ UERJ).

Microscópio eletrônico de Varredura – JEOL, mod. JSM 6510 LV equipado com Espectroscopia de raios X por dispersão em energia - EDS (Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura/ IQ/ UERJ).

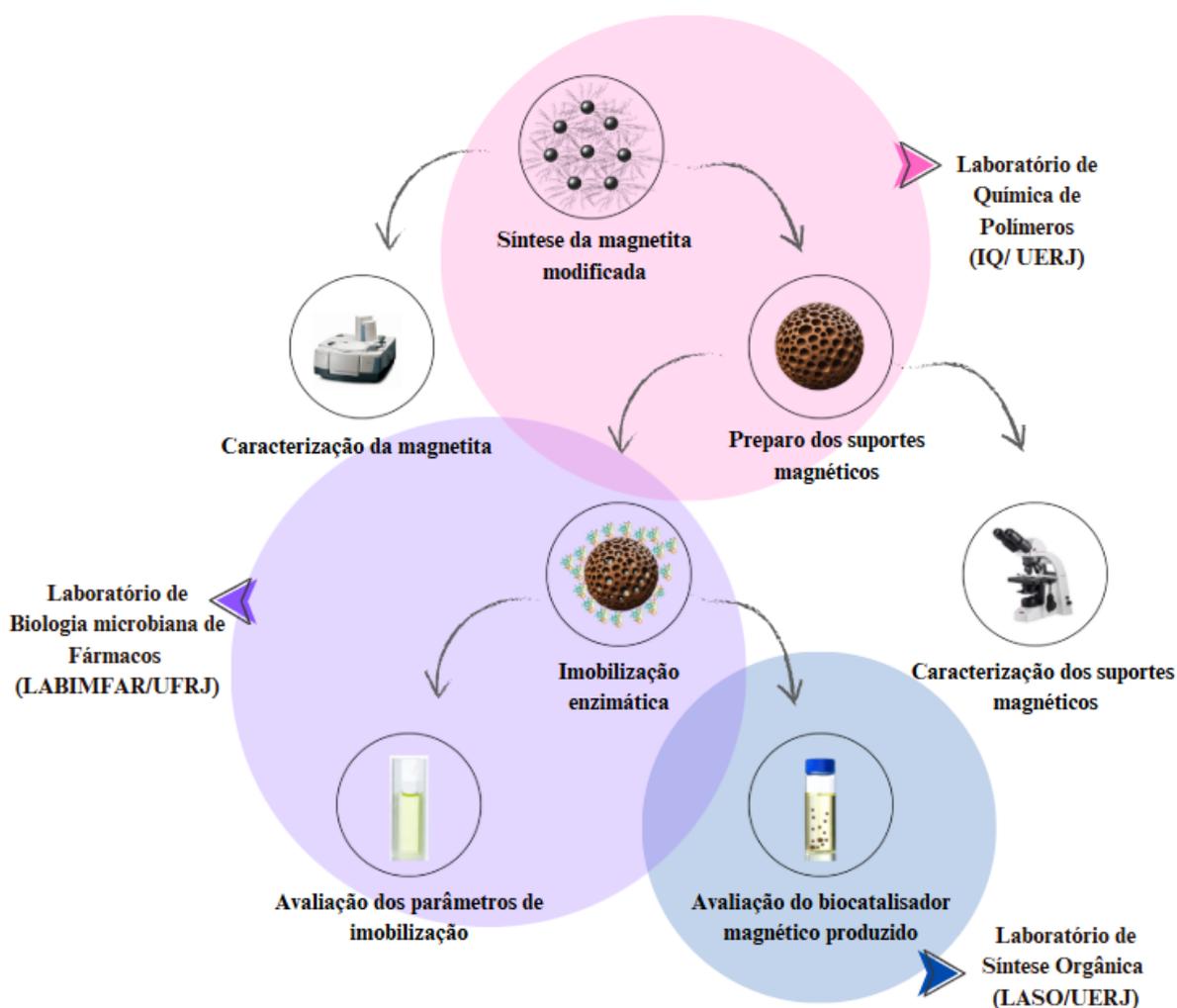
Microscópio óptico – Nikon Eclipse E200, lente Nikon E Plan 4x/0.10 - OFN20 WD 30 (Laboratório de Caracterização instrumental I/ IQ/ UERJ).

Placa de aquecimento com agitação magnética – IKA C-MAG, mod. HS 7 (Laboratório de Sínteses Orgânicas/ UERJZO).

3.2 Metodologia de preparo dos suportes magnéticos

Os biocatalisadores magnéticos obtidos nesta Dissertação foram desenvolvidos baseados em lipases de *Candida antarctica* (CALB) imobilizadas em suportes magnéticos. Os suportes poliméricos porosos magnéticos foram preparados pela polimerização em semissuspensão de estireno e divinilbenzeno contendo magnetita. A Figura 13 mostra o organograma das atividades desenvolvidas nesta Dissertação.

Figura 13 - Organograma de atividades



3.2.1 Síntese da magnetita seguida de modificação com ácido oleico

A síntese da magnetita foi realizada pela técnica de coprecipitação baseada nos trabalhos de Castanharo *et al.* (2015) e Silva *et al.* (2022) com adaptações. Em dois béqueres de 500 mL, foi adicionado em um 140 g de FeCl_3 e no outro 70 g de FeSO_4 . Em seguida, foram adicionados 250 mL de água destilada e deionizada em cada béquer para a dissolução completa dos sais. O sistema reacional, composto por um balão tritubulado de 1 L, provido de agitador mecânico e condensador de bolas, foi montado e as soluções foram vertidas para o balão e misturadas com o auxílio de agitação mecânica à aproximadamente 450 rpm, em temperatura ambiente e sob atmosfera de N_2 , obtendo-se uma solução de coloração avermelhada.

Sob as mesmas condições, foi adicionada lentamente à mistura 650 mL de solução de NH_4OH . Após o término da adição, a temperatura foi elevada a 70 °C e mantida nesta temperatura por 1 hora. Após 1 h de reação, obteve-se um precipitado preto. O precipitado foi transferido para um béquer e lavado diversas vezes com água destilada e deionizada. A lavagem consistiu em adicionar água destilada e deionizada ao béquer contendo a magnetita, deixá-lo em repouso por 1 h, em média, com um ímã no fundo externo do béquer. Após o tempo de repouso, a água foi vertida e descartada, enquanto a magnetita permaneceu no fundo do béquer atraído pelo ímã. Este procedimento foi repetido até que o sobrenadante apresentasse pH em torno de 7. Em seguida, 20 gotas de HCl foram adicionadas à magnetita contida no béquer.

Posteriormente, parte do material foi transferido para outro béquer de 1 L e, em seguida, coberto por papel alumínio para minimizar a incidência de luz sobre a magnetita. À esta parte da magnetita, foram adicionados 150 mL de ácido oleico sob agitação magnética branda e sem atmosfera de nitrogênio à uma temperatura de 80°C. Após o término da adição do ácido oleico, a mistura reacional permaneceu nesta temperatura por 30 minutos. Então, esta mistura foi lavada com etanol diversas vezes para a retirada do excesso de ácido oleico. Em seguida, os materiais magnéticos em lama, tanto a parte modificada com ácido oleico, quanto a parte não modificada, foram transferidos para frascos cobertos por papel alumínio e armazenados em um dessecador, de onde o ar foi evacuado e substituído por nitrogênio. O procedimento de evacuação e substituição ar atmosférico por nitrogênio foi repetido a cada utilização da magnetita.

3.2.2 Caracterização da magnetita modificada e não modificada

A magnetita modificada e a magnetita não modificada preparadas nesta Dissertação foram caracterizadas de acordo com o trabalho de Castanharo *et al.* (2015) com adaptações. Os espectros de FTIR foram obtidos a partir de pastilhas de KBr na faixa de radiação infravermelho entre 4000 e 400 cm^{-1} . O comportamento magnético foi avaliado por meio do magnetômetro de amostra vibrante (VSM), onde cerca de 0,05 g das amostras foram adicionadas ao equipamento e o campo magnético aplicado variou de -15000 G a 15000 G. O tempo total de cada análise foi de 10 minutos, sendo os dados coletados a cada segundo, sob temperatura ambiente.

As resistências térmicas foram verificadas por termogravimetria (TG). Em torno de 15 mg das amostras foram submetidas a uma faixa de temperatura de 50 a 800°C, com velocidade de aquecimento de 20°C/min, atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min e calibração com alumel a 154,2°C e níquel a 354,4°C. As estruturas cristalinas foram observadas por difração de raios-X (XRD) com geometria capilar, aquecimento *in-situ* e a análise de filmes. As varreduras foram feitas na faixa de 2theta: 10 - 60 °, com tamanho do passo de 0,02 °/passo, tempo do passo de 0,3 s/passos e velocidade do scan (tamanho do passo*60/tempo do passo) de 4 °/min. Os dados obtidos pela análise foram submetidos ao software PANalytical X'Pert HighScore Plus 3.0 e a equação de Scherrer foi empregada para estimar o tamanho dos cristalitos (Equação 1).

$$t_c = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos(\theta)} \quad (1)$$

Sendo, t_c : tamanho de cristalitos; K: Constante relacionada a geometria dos cristais (geralmente emprega-se 0,91 para geometrias desconhecidas); λ : Comprimento de onda da radiação eletromagnética (1,54059 nm); β = Largura a meia altura do pico de difração (também denominada FWHM) e θ = Ângulo de difração.

3.2.3 Obtenção dos suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnéticos

Três suportes poliméricos com propriedades magnéticas foram obtidos pela técnica de polimerização em semissuspensão aquosa, adaptada da metodologia publicada por Castanharo *et al.* (2015). A relação fase orgânica/fase aquosa foi de 1:4 v/v (50 mL / 200 mL). A fase orgânica foi composta por iniciador 2,2' – azo-bis-isobutironitrila (AIBN) 2% molar (mols de AIBN em relação ao número total de mols de monômero), magnetita (10% m/v), estireno (40% m/v), divinilbenzeno (60% m/v) e o diluente *n*-heptano, variando o grau de diluição (50%, 100 % e 150% v/v). A fase aquosa tinha composição fixa, consistindo em 200 mL de água destilada e deionizada, 2% m/v de poli(álcool vinílico) (PVA) e 2% m/v de NaCl . A Tabela 3 mostra a composição da fase orgânica dos suportes magnéticos.

Tabela 3 - Composição da fase orgânica para a preparação dos suportes magnéticos

Suporte	Monômero Vinílico	Monômero Divinílico	Material Magnético	Diluyente	Grau de diluição	Iniciador
S1	S (40% m/v)	DVB (60% m/v)	Magnetita (10% m/v)	<i>n</i> -heptano	50%	AIBN (2% m/v)
S2					100%	
S3					150%	

Legenda: S: Estireno; DVB: Divinilbenzeno; AIBN: 2,2' – azo-bis-isobutironitrila.

Fonte: A autora, 2025.

Em um balão tritubulado de 250 mL foi adicionada a fase orgânica. Após a adição, a temperatura foi elevada a 60°C e a mistura reacional foi mantida nesta temperatura por 30 minutos sob atmosfera de nitrogênio e agitação mecânica de 150 rpm para a pré-polimerização da fase orgânica. A Figura 14 mostra uma imagem do sistema operacional da polimerização. Terminado o tempo de pré-polimerização, a fase aquosa foi adicionada ao reator contendo a fase orgânica. A temperatura foi elevada a 80 °C e a polimerização foi conduzida por 22 h, sob atmosfera de nitrogênio e agitação mecânica de 400 rpm. Ao final da polimerização, os suportes

magnéticos obtidos foram lavados abundantemente com água destilada e posteriormente, etanol. Em seguida, foram filtrados a vácuo e secos em estufa a 60°C por 24 h.

Figura 14 - Sistema operacional da polimerização



Nota: Banho termostaticado sobre um elevador. Sobre o banho, balão tritubulado fixado a uma haste com garra, acoplado a um condensador de bolas (por sua vez, associado a uma linha de nitrogênio) e a um mancal e um impelidor unidos a um agitador mecânico.

Fonte: A autora, 2025.

3.2.4 Caracterização dos suportes magnéticos

Após a secagem, os suportes magnéticos sintetizados foram caracterizados por microscopia ótica (OM), microscopia eletrônica de varredura (SEM), espectroscopia por energia dispersiva (EDS), espectrometria de absorção na região do infravermelho com

transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TG), difração de raios X (XRD), magnetometria de amostra vibrante (VSM), análise de área específica e porosidade (ASAP), densidade aparente (D_{ap}) e grau de inchamento (I).

A microscopia ótica foi empregada para avaliar a morfologia dos suportes magnéticos, utilizando um microscópio óptico Nikon eclipse E200, lente Nikon E Plan 4x/0.10 (OFN20 WD 30) com sistema de aquisição de imagens acoplado a um computador, por onde foi feita a visualização. As amostras foram colocadas em uma lâmina de vidro e submetidas à ação de um feixe luminoso para observação e digitalização das imagens. Foram feitas imagens com um aumento de 40x. Esta análise permitiu a visualização do aspecto externo das partículas de copolímero; como a morfologia e a presença de defeitos.

A morfologia dos suportes também foi analisada por SEM em que, previamente, as amostras foram depositadas em uma fita de carbono, a fim de aumentar sua condutividade. Em seguida, a amostra foi introduzida no aparelho onde um feixe de elétrons primários, gerado por um filamento tungstênio, varreu a amostra sofrendo modificações de acordo com as variações da superfície do material, em alto vácuo, sob tensão de aceleração de 10 kV. Os detectores de elétrons secundários forneceram imagens de topografia da estrutura da amostra, enquanto os detectores de elétrons retroespalhados forneceram imagens características de variação de composição. Acoplado ao SEM, o EDS detectou os raios X emitidos pela amostra permitindo a caracterização química do material. Os espectros de FTIR foram obtidos a partir de pastilhas de KBr utilizando uma razão amostra/KBr de 1/300 mg. Os espectros foram adquiridos usando um total de 4 varreduras na faixa de radiação infravermelho entre 4000 e 400 cm^{-1} e uma resolução de 4 cm^{-1} .

Os difratogramas de raios x foram obtidos sob as seguintes condições de análise: faixa de $2\theta = 10-60^\circ$, $0,02^\circ/\text{passo}$ com tempo de passo de 0,3s/passos, velocidade de $4^\circ/\text{min}$ e fonte de cobre. Os dados obtidos pela análise foram submetidos ao software PANalytical X'Pert HighScore Plus 3.0. A degradação térmica dos materiais foi verificada por termogravimetria, em que cerca de 15 mg de amostra foram colocadas em uma cápsula de platina, aquecida em atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 mL/min, a uma faixa de temperatura de 50 $^\circ\text{C}$ a 800 $^\circ\text{C}$ e uma velocidade de aquecimento de 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$. Os padrões de calibração foram: Alumel (154, 2 $^\circ\text{C}$) (liga de 95% Níquel e 5% Alumínio) e Níquel (354, 4 $^\circ\text{C}$). O comportamento magnético foi avaliado por meio do magnetômetro de amostra vibrante (VSM), onde cerca de 0,05 g das amostras foram adicionadas ao equipamento e o campo magnético aplicado variou

de -15000 G a 15000 G, o tempo total de cada análise foi de 10 minutos, sendo os dados coletados a cada segundo, sob temperatura ambiente.

A área específica dos suportes magnéticos foi determinada com base em resultados de adsorção de nitrogênio (ASAP) à superfície dos suportes magnéticos formando uma monocamada em diferentes pressões relativas na temperatura do nitrogênio líquido. As amostras foram pré-tratadas a 120°C por 4 horas para secagem e degaseificação antes de serem submetidas ao aumento da pressão com nitrogênio gasoso. Curvas de isotermas foram construídas correlacionando a quantidade de gás adsorvida aos suportes magnéticos (cm³/g) em função da pressão relativa (P/P₀) empregada. O modelo proposto utiliza a equação de Kelvin e relaciona o esvaziamento progressivo dos poros cheios de N₂ líquido com o decréscimo da pressão. O método matemático adotado foi o de Barret, Joyner e Halenda (BJH) (Teixeira; Coutinho; Gomes, 2001). A equação de BET foi utilizada na faixa linear da curva para o cálculo da área específica.

A determinação da densidade aparente (D_{ap}) das partículas foi realizada em triplicata, de acordo com a ASTM: American Society for Testing and Materials. D 1895-69: Annual Book of ASTM Philadelphia: ASTM; 1975. A densidade aparente foi determinada pesando-se 10 cm³ do suporte magnético em proveta graduada de 10 cm³. Os suportes foram empacotados aos poucos na proveta previamente pesada e em seguida, determinado o volume final ocupado. A Equação 2 foi empregada para determinar a densidade aparente (D_{ap}) dos suportes magnéticos.

$$D_{ap} = \frac{m}{v} \quad (2)$$

Sendo, D_{ap} : densidade aparente (g/mL); m: massa do copolímero (g); v: volume aparente do polímero na proveta após o empacotamento (mL).

O grau de inchamento (I) dos suportes magnéticos em água e etanol foi determinado em triplicata através de método descrito na literatura por Rabelo (1993). Cerca de 3 ml de suporte magnético seco foi adicionado a uma proveta de 10 mL. Com o auxílio de um bastão de vidro com extremidade de borracha, os copolímeros foram empacotados nas provetas para realizar a leitura do volume inicial (V_i). Em seguida, adicionou-se lentamente pelas bordas da

proveta o solvente (água ou etanol), aproximadamente quatro vezes o volume da amostra compactada. Agitação manual e leves batidas com o bastão de vidro com extremidade de borracha foram empregadas para a eliminação das bolhas de ar. O suporte magnético permaneceu em contato com o solvente por 48 horas, com a proveta selada com plástico filme. Após o tempo de contato, o volume final (Vf) foi verificado e o grau de inchamento foi calculado através da equação (Equação 3):

$$I = \frac{(Vf - Vi)}{Vi} * 100 \quad (3)$$

Sendo, I: grau de inchamento; Vi: volume do suporte magnético seco empacotado (mL) e Vf: volume do suporte magnético em contato com o solvente após 48 horas (mL).

3.3 Metodologia de preparo do biocatalisador magnético

3.3.1 Pré-tratamento dos suportes

O pré-tratamento dos suportes magnéticos é a etapa que antecede a imobilização enzimática, com o objetivo de melhorar e permeação da solução enzimática dentro dos poros dos suportes (Pinto *et al.*, 2018). Este procedimento foi realizado conforme a metodologia descrita por Cipolatti *et al.* (2018); Pinto *et al.* (2018); Manoel *et al.* (2016); Pinto;Freire;Pinto (2014) e Cunha *et al.* (2014). Um tubo falcon de 50 mL de capacidade contendo 2 g de suporte (S1, S2 ou S3) e 25 mL de etanol PA 95% foi mantido sob agitação de 30 rpm em um agitador tipo Roller por 30 min (Figura 15). Após o tempo de contato, os suportes foram filtrados, em

funil de vidro equipado com papel de filtro pregueado suportado em um erlenmeyer de 250 mL, e lavados abundantemente com água destilada. Depois, os suportes foram mantidos em contato com água destilada sob agitação de 30 rpm em um agitador tipo Roller por 30 min. Em seguida, foram filtrados. Por fim, os suportes foram mantidos em contato com tampão fosfato de sódio 5mM pH 7 sob agitação de 30 rpm em um agitador tipo Roller por 30 min. Terminado o tempo de contato, os suportes magnéticos foram filtrados e armazenados na geladeira (4 °C) até o uso no processo de imobilização.

Figura 15 - Unidade experimental para o pré-tratamento dos suportes



Fonte: A autora, 2025.

3.3.2 Imobilização de CALB nos suportes magnéticos

A técnica de imobilização por adsorção e a determinação dos parâmetros de imobilização foram conduzidos conforme os trabalhos de Pinto (2017); Cunha *et al.* (2014); Cunha *et al.* (2011); Cunha *et al.* (2009) e Cunha *et al.* (2008). Primeiramente, uma solução enzimática de 60 mL de lipase B de *Candida antarctica* (CALB) e tampão fosfato de sódio (5 mM e pH=7) foi previamente preparada com atividade inicial de $94,0 \pm 10,7$ U/g_{suporte}. A imobilização foi realizada em tampão fosfato de sódio 5 mM e pH 7,0 (Fé *et al.*, 2024; Ribeiro *et al.*, 2022, Pinto *et al.*, 2020a). A imobilização foi realizada com 20 mL da solução enzimática

adicionada a tubos falcon contendo 2 g de suporte magnético. A interação foi conduzida por 5 h sob agitação a 36 rpm com auxílio de um agitador tipo Roller a 4 °C. Esta baixa temperatura objetivou evitar uma possível desnaturação da enzima durante o processo de imobilização.

Para o acompanhamento da cinética de imobilização, alíquotas de 250 µL do sobrenadante em diferentes tempos de imobilização (0, 15, 30, 45, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos) foram coletadas e armazenadas em microtubos para a avaliação da cinética de imobilização por meio da atividade hidrolítica da enzima solúvel no sobrenadante utilizando o substrato laurato de *p*-nitrofenila (*p*-NFL) (Item 3.3.3) e a concentração de proteínas do sobrenadante empregando o método de Bradford (Bradford, 1976). Os biocatalisadores magnéticos obtidos a partir da imobilização de CALB em suportes magnéticos foram filtrados e lavados com água destilada para a remoção de enzimas não adsorvidas presentes na superfície dos biocatalisadores. Em seguida, foram secos em dessecador e armazenados na geladeira (4 °C).

3.3.3 Determinação da atividade hidrolítica da lipase solúvel e dos biocatalisadores magnéticos

Primeiramente, em um espectrofotômetro Jasco Mod. V-730bio acoplado a um banho de aquecimento com recirculação e controle de temperatura, uma curva de calibração foi construída relacionando diferentes concentrações de *p*-nitrofenol (produto da hidrólise do laurato de *p*-nitrofenila) em uma solução tampão fosfato de sódio 25 mM a 30 °C ($\lambda=412$ nm). Desta forma, o fator de correlação (*f*) entre as variáveis, absorbância e concentração de *p*-NF em mM, pôde ser determinado e empregado nas equações para determinação dos parâmetros de imobilização.

Para a dosagem da atividade hidrolítica das enzimas solúveis nas alíquotas do sobrenadante da imobilização, 0,005 mL das alíquotas foram adicionadas a uma cubeta de vidro de 3 mL contendo 2,2 mL de solução tampão fosfato de sódio (25 mM e pH=7) previamente preparada. A cubeta foi acoplada ao espectrofotômetro com temperatura controlada a 30°C e

adicionou-se 0,25 mL de substrato *p*-NFL (2,3 mM) previamente preparado (5 mL de acetonitrila, 5 mL de dimetilsulfóxido e 0,0086 g de palmitato de *p*-nitrofenila), iniciando-se assim, a reação de hidrólise. Esta análise foi feita em triplicata.

A evolução das reações de hidrólise foi acompanhada por curvas de absorvância por minuto fornecidas pelo equipamento durante 3 minutos de reação. O coeficiente angular (abs/min) obtido foi utilizado para o cálculo da atividade hidrolítica (Equação 4). A atividade hidrolítica (AH) expressa em U/mL corresponde a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1 μ mol de produto (*p*-nitrofenol) por minuto de reação. O U/mL corresponde a atividade hidrolítica da enzima solúvel em 1 mL de solução enzimática.

$$AH = \frac{\alpha * V_f * f}{V_e} \quad (4)$$

Sendo, AH: Atividade hidrolítica (U/mL); V_f : volume final do meio reacional (mL); f : fator de correlação obtido a partir da curva de calibração do *p*-nitrofenol em tampão fosfato de sódio 25 mM a 30°C, V_e : volume de solução enzimática devidamente diluída (mL) e α : coeficiente angular obtido a partir da reta de avanço da reação de hidrólise.

A atividade hidrolítica dos biocatalisadores magnéticos (BioS1, BioS2 e BioS3) também foi avaliada para o substrato *p*-NFL. Inicialmente, 5mL de tampão fosfato de sódio (25 mM, pH = 7,0) e 25 mg de biocatalisador magnético foram adicionados a um béquer de 25 mL sob placa aquecedora com agitação magnética moderada e temperatura a 30°C. Em seguida, 0,25 mL de substrato *p*-NFL foi adicionado ao béquer contendo a mistura reacional dando início a reação de hidrólise. As reações hidrolíticas em batelada foram feitas em triplicata para cada biocatalisador e substrato a 30°C por 5 min cada. Ao final de cada reação os biocatalisadores foram recuperados com o auxílio de um pegador de barras magnéticas e lavados com água destilada para posterior reuso.

Ao longo da reação, a cada 20 s alíquotas de 2500 μ L foram coletadas e adicionadas a uma cubeta de 3 mL acoplada a um espectrofotômetro com temperatura controlada (30°C) para a determinação da absorvância ($\lambda=412$ nm). Através das absorvâncias do meio reacional

relacionadas ao tempo em minutos foi possível plotar um gráfico de absorvância por minuto (abs/min) e em seguida, calcular o coeficiente angular da reta. A reta de abs/min reflete a evolução da reação de hidrólise e o coeficiente angular é correspondente à velocidade inicial da reação. Uma vez que o produto da hidrólise do substrato laurato de *p*-nitrofenila é o cromóforo *p*-nitrofenol, espera-se observar o aumento da absorvância do meio reacional ao longo do tempo de reação. O coeficiente angular de cada reta de abs/min foi empregado na equação de Atividade hidrolítica do biocatalisador. A determinação da atividade de hidrólise dos biocatalisadores foi realizada empregando a Equação 5.

$$AH_{bio} = \frac{\alpha * V_f * f}{m_{bio}} \quad (5)$$

Sendo, AH_{bio} : atividade hidrolítica do biocatalisador (U/g_{bio}); V_f : volume final do meio reacional (mL); f : fator obtido a partir da curva de calibração do *p*-nitrofenol em tampão 25 mM a 30 °C; m_{bio} : massa de biocatalisador (g); α : coeficiente angular da reta que descreve o avanço da reação hidrolítica.

O rendimento de imobilização (Ri) dos biocatalisadores magnéticos foi determinado empregando a Equação 6.

$$Ri = \frac{U_{teo} * 100}{U_e}; U_{teo} = U_e - U_s \quad (6)$$

Sendo, Ri: rendimento de imobilização (%); U_{teo} : atividade enzimática teoricamente adsorvida ao suporte (U/g_{suporte}); U_e : atividade da solução enzimática presente no sobrenadante antes de iniciar o processo de imobilização (U/g_{suporte}); U_s : atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização (U/g_{suporte}).

3.3.4 Determinação da concentração de proteínas pelo método de Bradford

O método de Bradford, reproduzido amplamente pela literatura, foi empregado para este acompanhamento cinético (Bradford, 1976). Primeiramente, o fator de correlação K foi determinado por meio da curva de calibração da albumina de soro bovino (BSA), empregada como padrão, no comprimento de onda $\lambda=595$ nm. Posteriormente, uma mistura de 190 μL de solução de Bradford comercial e 10 μL de cada alíquota coletada ao longo da imobilização foi adicionada a poços em microplaca de acrílico. Em seguida, a placa foi acoplada ao espectrofotômetro para a realização da leitura com o seguinte comprimento de onda, $\lambda=595$ nm. As análises foram realizadas em triplicata. O coeficiente angular obtido pela curva de calibração de BSA foi empregado para determinar a concentração de proteínas (mg/mL) em cada alíquota por meio das absorbâncias observadas.

3.3.5 Avaliação da atividade de esterificação e conversão do ácido oleico em oleato de etila

Os biocatalisadores magnéticos obtidos também foram avaliados quanto à atividade de esterificação. Primeiramente, em um frasco de vidro de 10 mL foram adicionados os substratos, ácido oleico e etanol, em uma razão molar de 1:2, respectivamente. A mistura foi homogeneizada em um agitador tipo Roller a 50 rpm e 40°C por 10 min. Em seguida, adicionou-se 2,5% m/m de biocatalisador, dando início a reação. As reações foram conduzidas em batelada com agitação em um agitador tipo Roller a 50 rpm e 40°C por 24 h. A temperatura do meio reacional foi mantida com o auxílio de uma incubadora abrigando a unidade experimental (frascos contendo o meio reacional comportados sob um agitador tipo Roller). A Figura 16 mostra a unidade experimental empregada.

Ao longo de cada reação, alíquotas de 50 μL foram coletadas no tempo zero, 0,25 h e 24 h de reação. As alíquotas foram pesadas e em seguida, aproximadamente 20 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) (v/v) foi adicionada a erlenmeyers de 50 mL contendo as alíquotas. Esta mistura de solventes foi empregada para interromper a reação e extrair do ácido oleico não consumido presente no meio reacional. As amostras foram tituladas manualmente empregando uma solução de hidróxido de sódio 0,04 M e uma solução de fenolftaleína 0,01 M como indicador ácido-base. Por meio do consumo de soda da titulação foi possível determinar a atividade de esterificação (U/g_{bio}) do biocatalisador produzido e a acidez das alíquotas, que por sua vez foi empregada para determinar a conversão de substratos em produtos (%).

Ao final da reação, os biocatalisadores magnéticos foram recuperados com o auxílio de um ímã com força de tração de 80 kg, lavados duas vezes com água destilada e 1 vez com etanol 70% e em seguida, armazenados úmidos a 4°C. A Equação 7 foi empregada para determinar a acidez das alíquotas. A Equação 8 foi aplicada para determinar o percentual de conversão do ácido oleico em oleato de etila após 24 h de reação. A Equação 9 foi utilizada para estabelecer a atividade de esterificação dos biocatalisadores magnéticos obtidos (U/g_{bio}). Vale ressaltar que a atividade de esterificação foi calculada empregando o tempo reacional em minutos onde havia aproximadamente 10% de conversão em cada reação. As reações foram conduzidas em triplicata e as alíquotas coletadas em triplicata.

$$\text{Acidez} \left(\% \frac{m}{m} \right) = \frac{(V_{\text{NaOH}i} - V_{\text{NaOH}f}) * C_{\text{NaOH}} * MM_{\text{AG}}}{10 * m_a} \quad (7)$$

Sendo, Acidez: acidez de cada alíquota coletada do meio reacional (%); $V_{\text{NaOH}i}$: volume de titulante consumido para titular a amostra contendo a alíquota do tempo zero (0'), alíquota coletada antes de adicionar o biocatalisador (mL); $V_{\text{NaOH}f}$: volume de titulante consumido para titular a amostra contendo a alíquota de determinado tempo reacional, depois da adição do biocatalisador (mL); C_{NaOH} : concentração real da solução de hidróxido de sódio após ser padronizada com biftalato de potássio 0,04 M (mol/L); MM_{AG} : massa molar do ácido graxo empregado (g); m_a : massa da alíquota (g).

$$\text{Convers\~{a}o (\%)} = \frac{(\text{Acidez}_{\text{inicial}} - \text{Acidez}_{\text{final}}) * 100}{\text{Acidez}_{\text{inicial}}} \quad (8)$$

Sendo, $\text{Acidez}_{\text{inicial}}$: acidez das al\u00edquotas coletadas no tempo zero, antes da adi\u00e7\u00e3o do biocatalisador; $\text{Acidez}_{\text{final}}$: acidez das al\u00edquotas coletadas no tempo de 24 h de rea\u00e7\u00e3o.

$$AE_{\text{bio}} = \frac{(V_{\text{NaOH}i} - V_{\text{NaOH}f}) * C_{\text{NaOH}} * V_f * 1000}{V_e * t * m_e} \quad (9)$$

Sendo, AE_{bio} : atividade de esterifica\u00e7\u00e3o do biocatalisador (U/g_{bio}); $V_{\text{NaOH}i}$: volume de titulante consumido para titular a amostra contendo a al\u00edquota do tempo zero (0'), al\u00edquota coletada antes de adicionar o biocatalisador (mL); $V_{\text{NaOH}f}$: volume de titulante consumido para titular a amostra contendo a al\u00edquota do \u00faltimo tempo reacional (mL); C_{NaOH} : concentra\u00e7\u00e3o real da solu\u00e7\u00e3o de hidr\u00f3xido de s\u00f3dio ap\u00f3s ser padronizada com biftalato de pot\u00e1ssio 0,04 M (mol/L); V_f : volume final do meio reacional (mL); V_e : volume da al\u00edquota retirada para titula\u00e7\u00e3o (mL); t : tempo de rea\u00e7\u00e3o (min); m_e : massa de biocatalisador utilizada na rea\u00e7\u00e3o (g).

Figura 16 - Unidade experimental empregada para as rea\u00e7\u00f5es de esterifica\u00e7\u00e3o



Nota: Frascos reacionais sob um agitador tipo Roller, por sua vez contido em uma incubadora.
Fonte: A autora, 2025.

É importante mencionar também que reações controle de esterificação foram realizadas. Reações foram conduzidas sem o biocatalisador e com o suporte magnético sem enzima imobilizada para avaliar se há conversão espontânea de ácido oleico em oleato de etila em 24 h e se os suportes magnéticos (sem as enzimas imobilizadas) podem apresentar alguma influência sobre a acidez do meio reacional, respectivamente, descartando a influência destes parâmetros nos resultados de atividade de esterificação e conversão de substratos em produtos. Para a determinação do percentual de conversão de ácido oleico em oleato de etila (C%) foi considerado 24 h de reação para favorecer a logística da execução das etapas experimentais desta Dissertação. Alguns trabalhos na literatura consideram este tempo reacional para a determinação do percentual de conversão de substratos em produtos (Cipolatti *et al.*, 2021; Bento *et al.*, 2017).

3.3.6 Estudo de influência da temperatura na esterificação

Um estudo sistemático empregando diferentes temperaturas foi realizado com o objetivo de avaliar a influência da temperatura na atividade de esterificação do biocatalisador magnético (BioS2). Em seguida, comparar com o desempenho da lipase B de *Candida antarctica* livre comercial (Lipozyme® CALB) nas mesmas condições. Para este estudo, em um frasco de 10 mL adicionou-se os substratos, ácido oleico e etanol (razão molar 1:2). A mistura foi mantida sob agitação, a 50 rpm por 10 minutos.

As temperaturas empregadas foram as seguintes: 30, 40, 50 e 60°C. Após o tempo determinado para a homogeneização do meio reacional, alíquotas de 50µL foram coletadas e em seguida, adicionou-se o biocatalisador. As seguintes quantidades de biocatalisador foram empregadas para cada reação: 2,5% (m/m) do biocatalisador magnético (BioS2) ou 24 µL da lipase livre comercial. A reação de esterificação iniciou com a adição do biocatalisador e foi conduzida por 24 h. Alíquotas de 50 µL foram coletadas nos tempos zero, 0,25 h e 24 h, pesadas e tituladas com solução de NaOH 0,04 M para posterior cálculo da atividade de esterificação (U/g_{bio}) e da conversão do ácido oleico em oleato de etila (%).

Vale ressaltar que as reações foram feitas em triplicata nas quatro temperaturas propostas pelo estudo. As alíquotas do meio reacional também foram coletadas em triplicata e adicionadas a 20 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1) a fim de extrair os ácidos graxos para a titulação. A massa do biocatalisador (BioS2) corresponde a 2,5% da massa dos substratos empregados na reação. O volume de Lipozyme® CALB utilizado corresponde ao volume da lipase livre comercial com atividade de esterificação (U/mL) aproximadamente equivalente a atividade de esterificação de 2,5 % m/m do biocatalisador obtido, BioS2 (U/g_{bio}). A unidade experimental foi a mesma empregada na avaliação da atividade de esterificação dos biocatalisadores.

3.3.7 Influência da imobilização sobre a especificidade das enzimas aos substratos ácidos graxos

Um estudo variando o tamanho da cadeia carbônica dos ácidos graxos utilizados na esterificação foi conduzido empregando o biocatalisador produzido (S2) e a CALB, com o objetivo de avaliar o efeito da imobilização sobre a especificidade ao tamanho de cadeia carbônica de ácidos graxos alifáticos.

Em um frasco de 10 mL, foram adicionados os substratos, ácido graxo e etanol (razão molar 1:5). A mistura permaneceu sob agitação em um agitador tipo Roller por 10 minutos, a 60°C e 50 rpm. Após o tempo determinado para homogeneização do meio reacional, alíquotas de 50 µL foram coletadas e 2,5% m/m do biocatalisador BioS2 ou Lipozyme® CALB foi adicionado, iniciando assim a reação de esterificação. Decorridos 15 minutos de reação, alíquotas de 50 µL foram coletadas do meio reacional para titulação com solução de NaOH 0,04 M e posterior cálculo da atividade de esterificação dos biocatalisadores (U/g_{bio}). Após 24 h de reação, alíquotas de 50 µL foram coletadas do meio reacional para pesagem, titulação e posterior cálculo da conversão dos ácidos graxos em seus respectivos ésteres etílicos (%).

Para este estudo, os ácidos graxos selecionados foram: ácido cáprico (C10:0), ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido esteárico (C18:0) e ácido oleico (C18:1). Vale mencionar também, que a temperatura escolhida para conduzir as reações (60°C) e a razão molar entre os ácidos graxos e o etanol (1:5) foram selecionadas a fim de favorecer a solubilidade dos ácidos graxos no estado sólido.

É importante ressaltar também que as reações foram feitas em triplicata para cada ácido graxo selecionado. As alíquotas foram coletadas em triplicata e adicionadas a 20 mL de uma mistura de acetona e etanol (1:1) a fim de interromper a reação e extrair os ácidos graxos que não reagiram para posterior titulação. A unidade experimental utilizada foi a mesma empregada para a avaliação da atividade de esterificação dos biocatalisadores produzidos e para o estudo de estabilidade em diferentes temperaturas.

3.3.8 Avaliação do reuso do biocatalisador

A reutilização de BioS2 foi avaliada para reações de esterificação conforme metodologia descrita no item 3.3.5. Após cada ciclo, o biocatalisador foi separado magneticamente, lavado duas vezes com água destilada e uma vez com etanol 70%. A atividade de esterificação (U/g_{bio}) do primeiro uso corresponde a 100% da atividade do biocatalisador. A atividade de esterificação e o percentual de conversão de ácido oleico em oleato de etila após cada uso foram avaliados.

A Figura 17 mostra como foi realizada a recuperação dos biocatalisadores magnéticos após as reações de esterificação. Primeiramente, o meio reacional foi vertido sem a perda de biocatalisador. Os biocatalisadores magnéticos permaneceram nos frascos de reação via campo magnético (Figura 17, A). Em seguida, os biocatalisadores foram lavados duas vezes com água destilada empregando agitação manual (Figura 17, B). Depois, foram lavados uma vez com etanol 70% também sob agitação manual (Figura 17, C) e, por fim, os biocatalisadores

recuperados (Figura 17, D) foram deixados de 10 a 15 minutos sobre a bancada para a evaporação do excesso de etanol 70% empregado na lavagem e posterior reutilização.

Figura 17 - Recuperação dos biocatalisadores ao final das reações de esterificação



Legenda: A, B, C e D correspondem à sequência de etapas para a recuperação do biocatalisador magnético, descritas e devidamente identificadas no parágrafo anterior.

Fonte: A autora, 2025.

3.3.5 Avaliação da dessorção da enzima imobilizada

Um estudo de dessorção foi conduzido para investigar a interação entre a lipase e o suporte magnético (S2), conforme metodologia de Sugahara; Varéa, (2014) com modificações. Primeiramente, 0,14 g do biocatalisador BioS2 foi agitado magneticamente a 200 rpm em 20 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) contendo 0,1 M de Triton X-100 por 30 min a 40 °C. Após o tempo determinado, os biocatalisadores foram filtrados e lavados com água destilada e etanol 70%. Em seguida, foram armazenados úmido a 4 °C. Os biocatalisadores foram avaliados quanto a atividade de esterificação (U/g_{bio}) e a conversão do ácido oleico em oleato de etila (%).

Alíquotas do sobrenadando foram coletadas antes da adição do biocatalisador e ao final do procedimento para a avaliação da atividade hidrolítica do sobrenadante ($U/g_{\text{sobrenadante}}$). Vale ressaltar que o estudo foi conduzido em triplicata e as condições reacionais para a

avaliação da atividade hidrolítica ($U/g_{\text{sobrenadante}}$) e da atividade de esterificação (U/g_{bio}) correspondem às descritas nos itens 3.3.4.1 e 3.3.4.2 respectivamente.

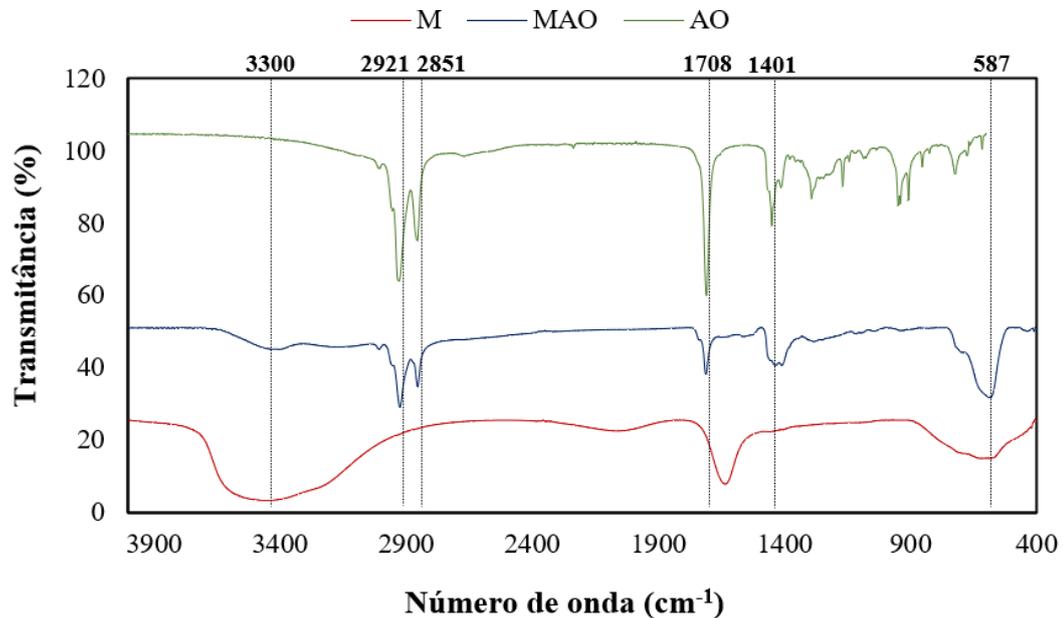
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta sessão primária foi dividida em três sessões secundárias. Primeiramente serão discutidos os resultados referentes a caracterização da magnetita modificada e não modificada sintetizadas nesta Dissertação. Em seguida, serão discutidos os resultados pertinentes a caracterização dos suportes magnéticos obtidos por polimerização em semissuspensão aquosa de estireno e divinilbenzeno, contendo magnetita, variando o grau de diluição em *n*-heptano. Por fim, serão conduzidas as discussões relacionadas aos parâmetros de imobilização obtidos através da imobilização da CALB nos suportes magnéticos sintetizados, seguida das discussões referentes aos estudos de avaliação do desempenho catalítico dos biocatalisadores obtidos.

4.1 Caracterização da magnetita

A análise de FTIR foi empregada para a confirmação da síntese de óxidos de ferro e da modificação com ácido oleico. A Figura 18 mostra os espectros obtidos para a magnetita (M), a magnetita modificada (MAO) e o ácido oleico puro (AO).

Figura 18 - Espectros de FTIR da magnetita (M), da magnetita modificada (MAO) e do ácido oleico (AO)



Fonte: A autora, 2025.

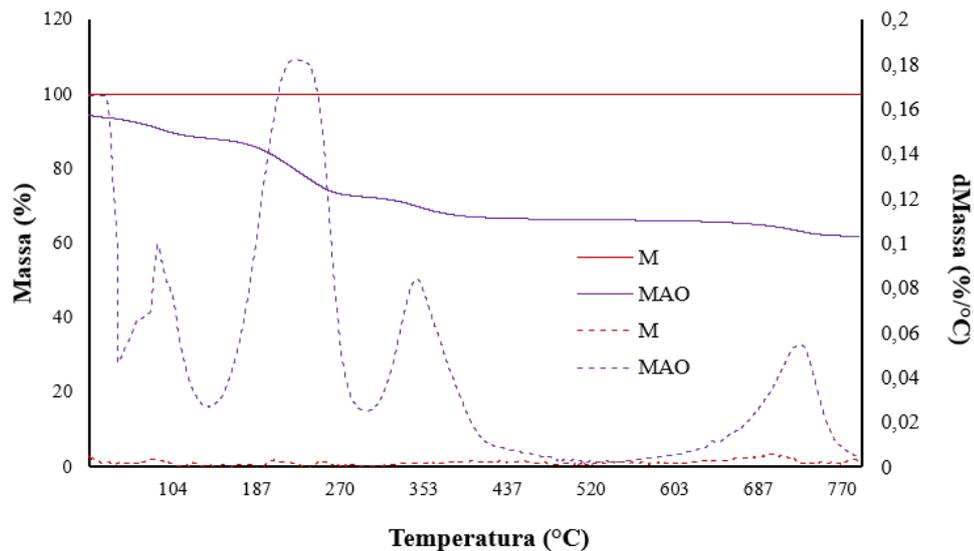
Como pôde ser visto, os espectros da magnetita (M) e da magnetita modificada (MAO) apresentam em 587 cm^{-1} a banda atribuída à ligação Fe-O das partículas de magnetita, indicando a síntese de óxidos de ferro. Nos espectros do AO e do MAO, as bandas 2921 e 2851 cm^{-1} correspondem às ligações assimétricas e simétricas de CH_2 , respectivamente. A presença da banda observada em 1708 cm^{-1} no espectro da MAO e também presente no espectro do AO, pode ser atribuída à ligação C=O do grupo carboxila, indicando a presença de ácido oleico na superfície da magnetita. Vale ressaltar, que estas bandas não são observadas no espectro de magnetita pura (M) (Queiroz, 2011; Wang *et al.*, 2010).

A banda observada em 1401 cm^{-1} , presente nos espectros do MAO e do AO, é atribuída às vibrações dos grupos C=O de grupos carboxilatos (RCOO^-), indicando a presença de oleato adsorvido quimicamente na superfície das partículas de magnetita (Queiroz, 2011; Wang *et al.*, 2010). Nos espectros de M e MAO, a banda em 3300 cm^{-1} corresponde a banda de deformação axial de -OH que pode ser atribuída a umidade presente nas amostras (Castanharo, 2015).

A Figura 19 mostra as curvas de degradação térmica e derivada da perda de massa da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M). Conforme esperado, a curva de

degradação térmica da magnetita (M) obtida revelou que não houve perda de massa no intervalo de temperatura avaliado, de 50 °C a 800 °C, e a curva de degradação térmica da magnetita modificada com ácido oleico (MAO) apresentou quatro estágios de perda de massa, conforme outros trabalhos na literatura (Lourenço-Neto, 2024; Urian, 2021; Castanharo, 2015).

Figura 19 - Curvas de degradação térmica e derivada da perda de massa da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M)



Fonte: A autora, 2025.

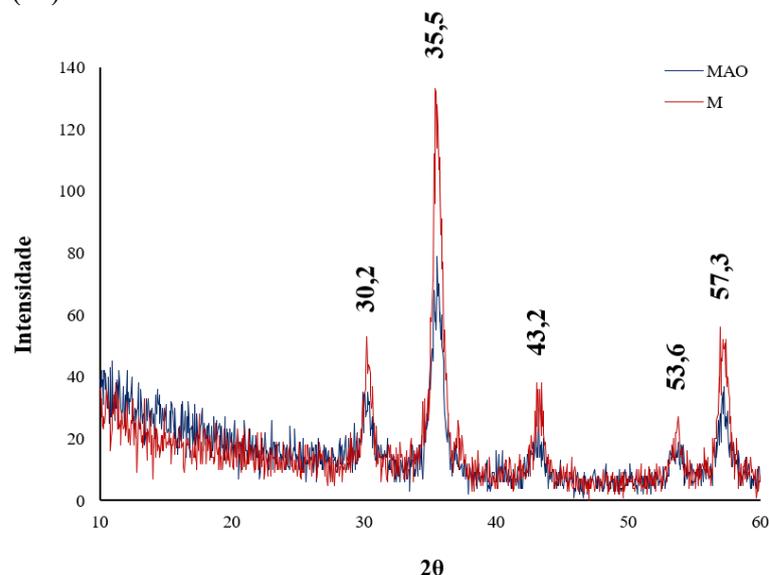
O primeiro estágio de perda de massa da curva do MAO, com início de degradação (T_{onset}) a 50 °C e velocidade máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) a 100 °C, resultou em uma perda de massa de aproximadamente 7%. Isso indica a presença de umidade na amostra, como detectado também por FTIR. Vale ressaltar que apesar dos suportes magnéticos terem sido empregados secos para a imobilização de enzimas, as amostras não foram devidamente secas em estufa para a análise termogravimétrica (Lourenço-Neto, 2024; Urian, 2021; Castanharo, 2015). O segundo, com início de degradação (T_{onset}) a 140 °C e velocidade máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) a 230 °C, resultou em uma perda de massa de aproximadamente 15%. Esta, pode ser atribuída a perda de massa do ácido oleico livre ou fisissorvido na magnetita (Lobato; Mansur; Ferreira, 2017; Castanharo, 2015; Queiroz, 2011).

O terceiro estágio de perda de massa da curva do MAO, com T_{onset} a 300 °C e $T_{\text{máx}}$ a 350 °C, resultou em cerca de 5% de perda de massa. Pode ser atribuída a perda de massa do ácido oleico quimissorvido na magnetita (Castanharo, 2015; Queiroz, 2011; Roonassi, 2009), o que

corroborar com os resultados dos espectros de FTIR. Finalmente, o quarto estágio de perda de massa do MAO, com T_{onset} a 650 °C e $T_{\text{máx}}$ a 750 °C, resultou em cerca de 3% de perda de massa. Pode ser atribuída à redução das partículas de magnetita provavelmente causada por gases provenientes da decomposição do ácido oleico, conforme descrito por outros trabalhos na literatura (Urian, 2021; Lai, 2017; Lobato; Mansur; Ferreira, 2017; Ayyappan, 2008).

A difratometria de raios-X foi empregada para determinar a estrutura cristalina da magnetita produzida. A Figura 20 mostra os difratogramas da magnetita modificada (MAO) e da não modificada (M). Os óxidos de ferro foram identificados nos difratogramas por meio das raiais nos ângulos 2θ de 30,2°; 35,5°; 43,2°; 53,6° e 57,3°. Os resultados são similares aos descritos em outros trabalhos que avaliaram amostras de magnetita e maghemita (Urian, 2021; Mendes *et al.*, 2019; Lobato; Mansur; Ferreira, 2017), o que confirma a síntese de magnetita. Vale ressaltar que para diferenciar magnetita de maghemita não é possível por difratometria de raios-X. a técnica de espectroscopia Mössbauer seria indicada. Embora ela não tenha sido realizada, há relatos na literatura de que o método utilizado nesta Dissertação produz além de magnetita, maghemita e goethita, como contaminante, na qual a magnetita e a maghemita são os óxidos de ferro responsáveis pela característica magnética do material (Silva *et al.*, 2022; Castanharo, 2015).

Figura 20 - Difratograma de raios X da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M)



Fonte: A autora, 2025.

O tamanho médio de cristalitos foi estimado em 23,1 nm através da equação de Scherrer (Cullity, 1978). O resultado obtido sugere que houve sucesso na síntese de nanopartículas de magnetita (M). Isso é importante porque é esperado que nanopartículas magnéticas de tamanho inferior a 30 nm possuam propriedade superparamagnética (Urian, 2021; Castanharo, 2015). O tamanho de uma partícula pode ser estimado a partir do tamanho do cristalito usando a equação de Scherrer. No entanto, a equação de Scherrer é uma aproximação que funciona melhor para partículas quase esféricas (Ibiapino *et al.*, 2013). Os dados obtidos por XRD podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados quantitativos de XRD da magnetita produzida (M)

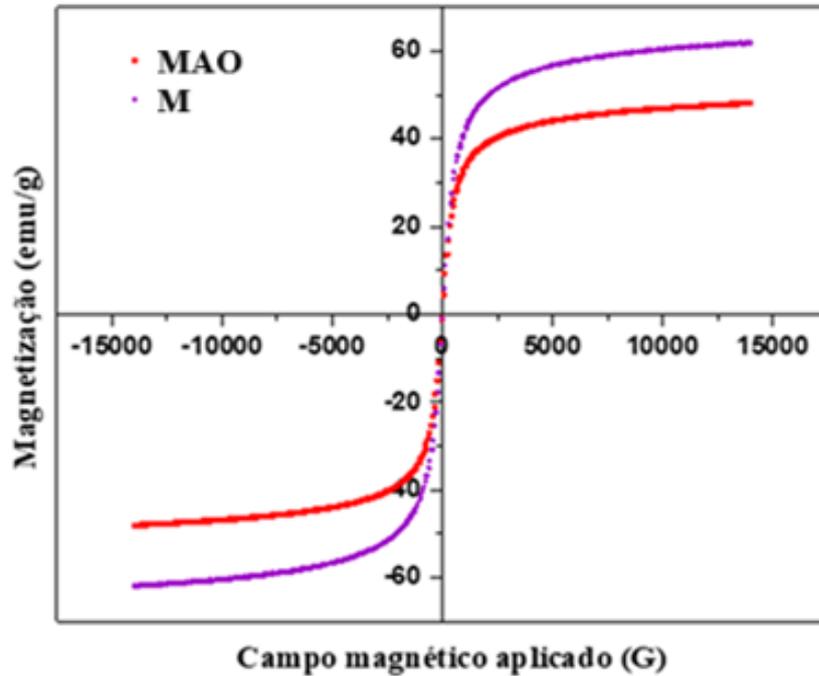
	Intensidade relativa (%)	2 θ ¹	FWHM ² (2 θ)	d-spacing ³ (Å)	Tamanho médio do cristalito (nm)
Magnetita	100,0	35,5	0,2	2,5	23,1
	30,3	30,2	0,4	3,0	
	23,8	57,3	0,4	1,6	
	20,6	43,2	0,4	2,0	
	8,1	53,6	0,8	1,7	

Legenda: ¹Ângulo 2Theta, ²Largura à meia altura dos picos e ³Distância entre planos.

Fonte: A autora, 2025.

As curvas de magnetização obtidas pela análise de magnetometria de amostra vibrante (VSM) da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M) podem ser vistas na Figura 20. Não foi observada a presença de ciclos de histerese nas curvas de magnetização das amostras analisadas.

Figura 21 - Curvas de magnetização da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M)



Fonte: A autora, 2025.

A magnetita obtida possui magnetização de saturação (M_S) próximo de valores consultados em literatura para nanopartículas de maghemita e magnetita (Lorenço-Neta, 2024; Costa *et al.*, 2019; Castanharo, 2015; Formiga *et al.*, 2013). Observou-se também uma redução na magnetização de saturação da magnetita modificada com ácido oleico (47,62 emu/g) em relação ao M_S da magnetita não modificada (61,68 emu/g), o que pode ser explicado pela adição de ácido oleico à massa total da amostra analisada. Uma vez que a magnetização de saturação de uma amostra é dada em relação à sua massa, é esperado que uma amostra composta por magnetita e qualquer outra substância sem propriedades magnéticas possua uma magnetização de saturação menor em comparação a uma amostra de magnetita pura (Lourenço-Neto, 2024; Castanharo, 2015; Lobato; Mansur; Ferreira, 2017).

A análise de VSM também revelou que os valores de magnetização remanescente (M_R), relação de remanescência (M_R/M_S) e força coerciva (H_c) de ambas as amostras são próximos de zero, o que indica que a magnetita sintetizada apresenta comportamento

superparamagnético. O comportamento superparamagnético da magnetita obtida evidencia que as partículas apresentam tamanho nanométrico, uma vez que o superparamagnetismo é um fenômeno que ocorre em nanopartículas magnéticas (Urian 2021; Lobato; Mansur; Ferreira, 2017). Estes resultados corroboram com os dados obtidos por XRD. Os dados quantitativos obtidos por VSM, da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M), podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados quantitativos de VSM da magnetita modificada (MAO) e não modificada (M)

Amostra	M_s (emu/g)	M_r (emu/g)	M_r/M_s	H_c (G)
M	61,680	0,590	0,009	15,960
MAO	47,620	1,190	0,039	15,960

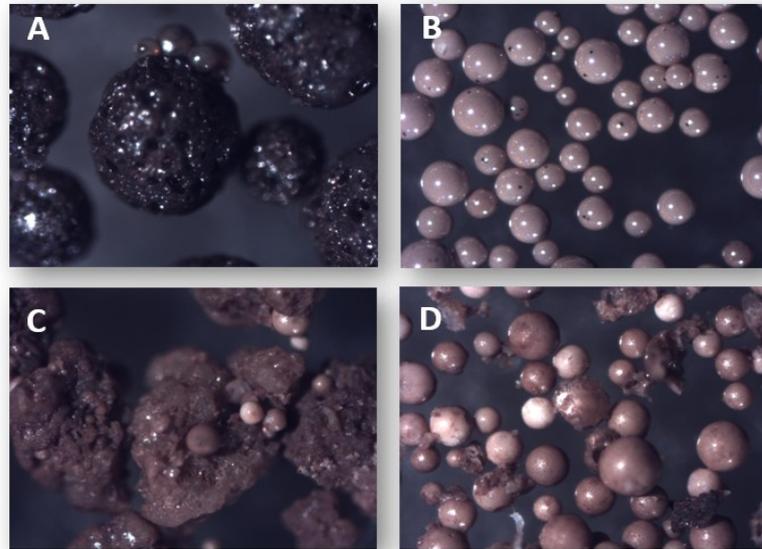
Legenda: M_s – Magnetização de saturação; M_r – Magnetização remanescente; M_r/M_s – Relação de remanescência e H_c – Força coerciva.

Fonte: A autora, 2025.

4.2 Caracterização dos suportes magnéticos

Para esta Dissertação, foram sintetizados três suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) com magnetita incorporada à matriz polimérica, variando o grau de diluição empregando o diluente *n*-heptano (50%, 100% e 150% em relação a massa molar de monômeros). Por meio da microscopia ótica (OM) e da microscopia eletrônica de varredura (SEM) os suportes magnéticos foram avaliados em relação a sua morfologia externa; como esfericidade, presença de defeitos, coloração (particularmente nas micrografias de OM) e formação de aglomerados de partículas. O SEM também foi empregado para a determinação do tamanho médio das partículas (Tabela 6). As micrografias de microscopia ótica dos suportes magnéticos sintetizados podem ser observadas na Figura 22. As micrografias de microscopia eletrônica de varredura destes suportes são mostradas nas Figuras 23, 24, 25 e 26.

Figura 22 - Micrografias de microscopia ótica dos suportes magnéticos sintetizados

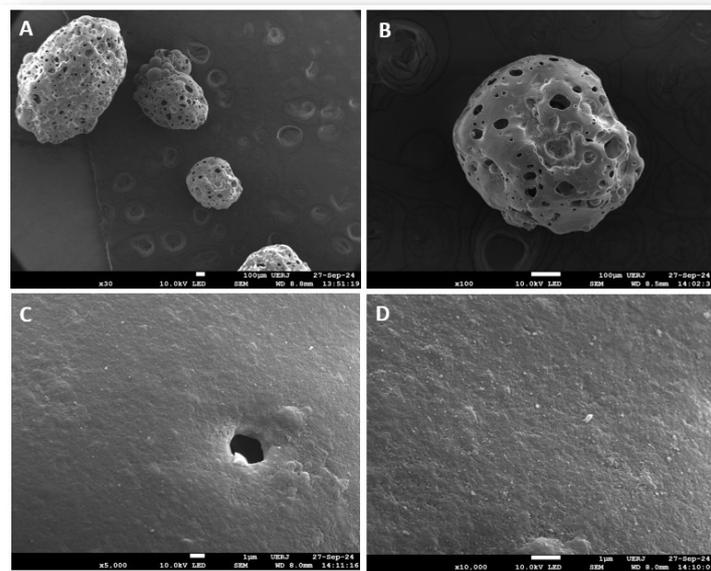


Legenda: (A) Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de *n*-heptano – S1; (B) Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano – S2 e (C) e (D) Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de *n*-heptano – S3.

Nota: Todas as micrografias foram obtidas com 40x de ampliação.

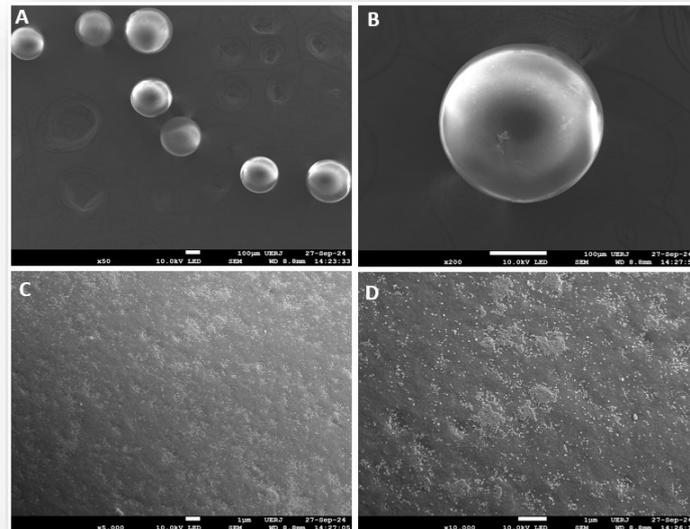
Fonte: A autora, 2025.

Figura 23 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos suportes magnéticos preparados com 50% de grau de diluição



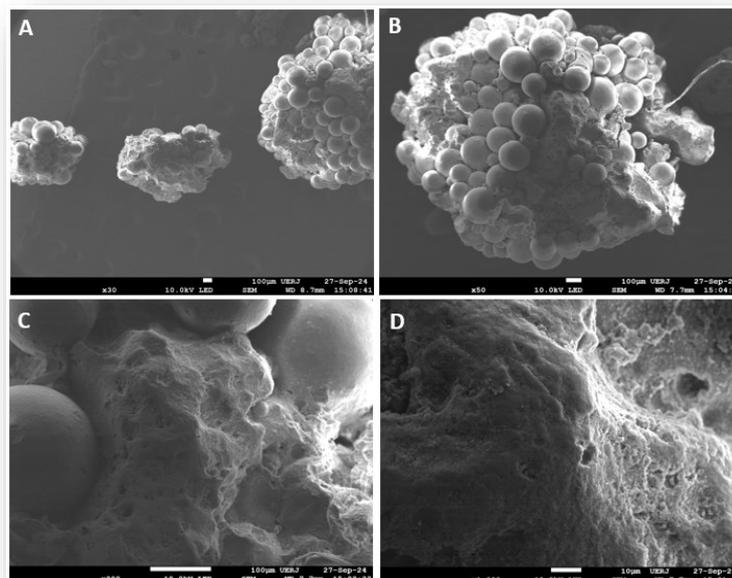
Fonte: A autora, 2025.

Figura 24 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos suportes magnéticos preparados com 100% de grau de diluição



Fonte: A autora, 2025.

Figura 25 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos suportes magnéticos preparados com 150% de grau de diluição



Fonte: A autora, 2025.

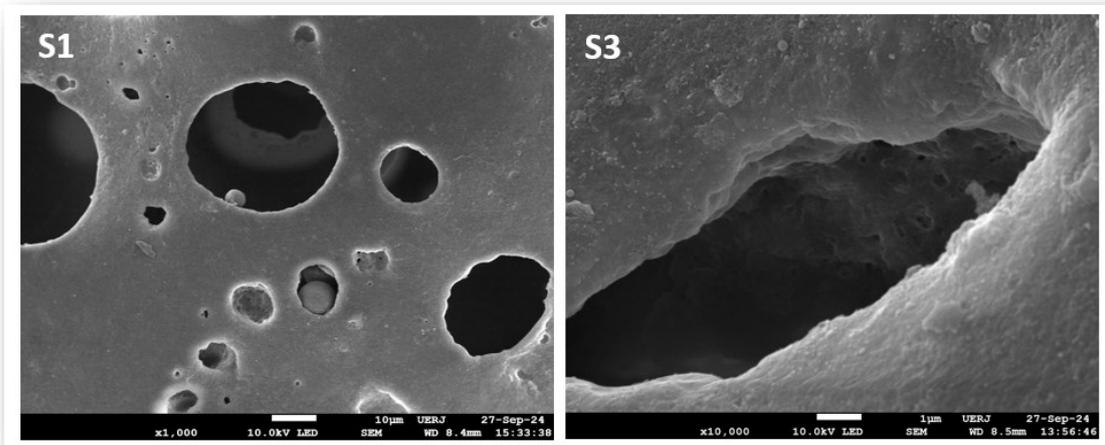
As micrografias dos suportes magnéticos sintetizados com 50% de grau de diluição (S1) (Figura 22, A e Figura 23) revelaram partículas polidispersas maiores que as microesferas obtidas em S2 (Figura 22, B e Figura 24) e S3 (Figura 22, D e Figura 25), de morfologia irregular com partículas esféricas menores incrustadas, cor uniforme indicativa de impregnação da magnetita na matriz polimérica e algumas esferas translúcidas incrustadas que podem indicar uma menor impregnação da magnetita (Figura 22, A). Os suportes magnéticos sintetizados com 100% de grau de diluição (S2) (Figura 22, B e Figura 24) apresentam partículas polidispersas com morfologia esférica, cor uniforme indicativa de impregnação da magnetita na matriz polimérica e pontos mais escuros na superfície que podem indicar aglomerados de nanopartículas magnéticas (Figura 22, B), os pontos escuros são observados na micrografia de SEM como protuberâncias sobre a superfície rugosa de S2 (Figura 24).

Os suportes magnéticos sintetizados com 150% de grau de diluição (S3) (Figura 22, C – D e Figura 25) apresentaram grandes estruturas poliméricas irregulares e com aspecto quebradiço em maior quantidade (Figura 22, C), algumas partículas esféricas polidispersas de coloração diversificada (Figura 22, D), o que indica uma impregnação irregular da magnetita entre as microesferas, além de algumas partículas esféricas quebradas e outras aglomeradas. A estrutura quebrada do suporte S3 pode estar associada ao alto grau de diluição empregado (150%) em comparação aos demais suportes (50 e 100%), uma vez que com o aumento da diluição dos monômeros em *n*-heptano espera-se a formação de polímeros com maiores diâmetros de poros (Rabelo; Coutinho; 1994a; Rabelo; Coutinho, 1994b; Rabelo, 1993). Estes espaços vazios maiores na estrutura polimérica podem diminuir a resistência mecânica do material afetando sua integridade estrutural.

Cunha *et al.* (2025) prepararam suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) não magnéticos por polimerização em suspensão aquosa empregando 100% de diluição em *n*-heptano. As micrografias de OM e SEM revelaram partículas microesféricas e polidispersas. Em contrapartida, Bento *et al.* (2017) prepararam suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnéticos por polimerização em suspensão aquosa empregando 50% de diluição em uma mistura de *n*-heptano: tolueno (1:1). Mostraram através das micrografias de SEM que as partículas obtidas eram polidispersas e disformes. Propuseram que a presença de magnetita (10% m/m) pode ter afetado a tensão interfacial responsável pela formação e manutenção de partículas esféricas durante a polimerização por suspensão aquosa.

A Figura 26 mostra as micrografias de S1 e S3 que permitem a visualização da estrutura interna dos suportes através das cavidades, revelando a superfície interna rugosa e porosa destes materiais, conforme outros trabalhos na literatura (Cunha *et al.*, 2025, Torquato *et al.*, 2020). Vale ressaltar também que os resultados observados nas micrografias de SEM corroboram com o observado nas micrografias de OM.

Figura 26 - Micrografias de microscopia eletrônica de varredura dos suportes magnéticos sintetizados com 50% (S1) e 150% (S3) de diluição em *n*-heptano



Fonte: A autora, 2025.

A Tabela 6 apresenta os resultados de grau de inchamento em água e etanol (%), densidade aparente (g/mL), diâmetro médio dos poros (Å), volume médio dos poros (cm³/g) e área específica (m²/g) dos suportes magnéticos sintetizados. A Figura 27 mostra as isotermas de adsorção e dessorção de nitrogênio dos suportes magnéticos obtidas através do ASAP. A Figura 28 mostra a distribuição do tamanho de poros dos suportes magnéticos.

Vale ressaltar que, o fenômeno de condensação capilar pode ser utilizado na determinação da distribuição do tamanho de poros das partículas desde que alguma função matemática correlacione o tamanho de poro com a pressão de condensação. A equação de Kelvin é a mais empregada para esse fim, contudo apresenta um limite máximo de aplicação na ordem de 250 Å, determinado pela dificuldade em se medir experimentalmente decréscimos muito pequenos da pressão de vapor, sendo esta uma limitação importante do emprego de dados

de fisiossorção de N_2 no cálculo de distribuição de tamanhos de poros das partículas usando equação de BJH (Teixeira; Coutinho; Gomes, 2001; Sing, 1985).

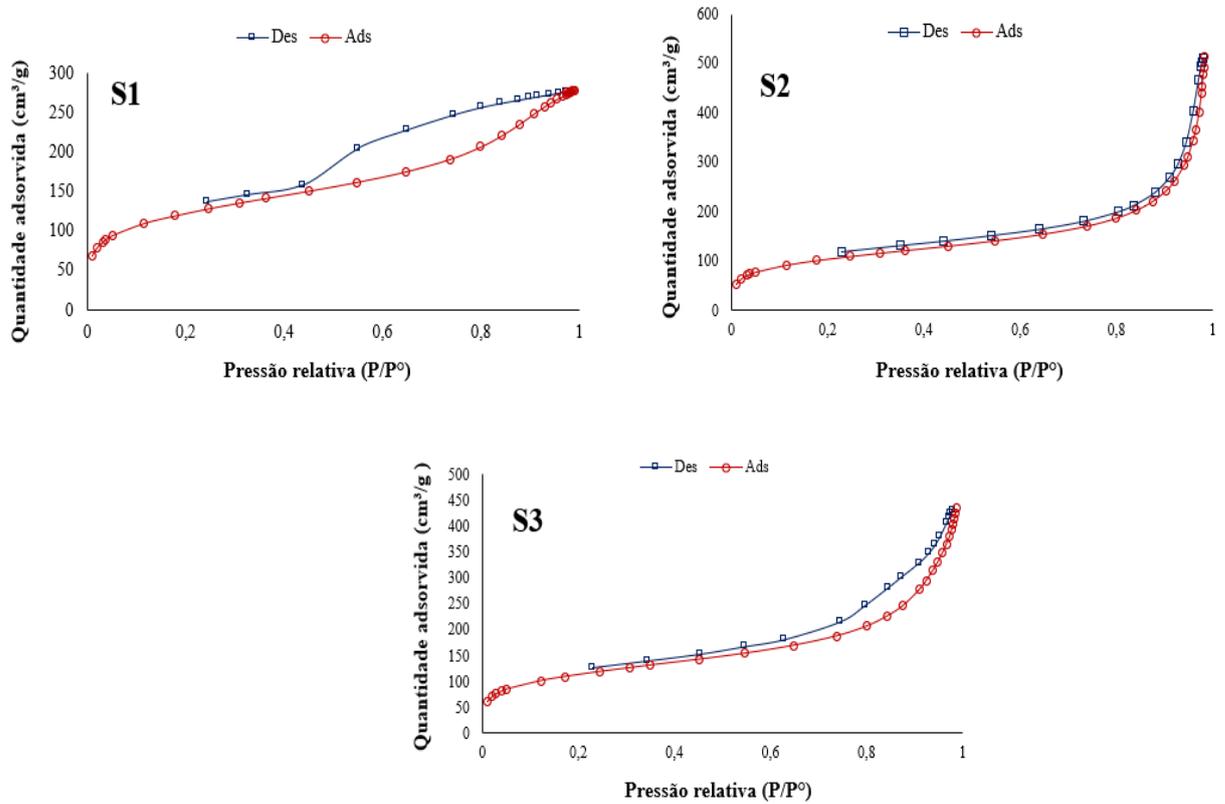
Tabela 6 - Características dos suportes magnéticos obtidos

Suporte Magnético	Grau de diluição em <i>n</i> -heptano (%)	Grau de inchamento em água (%)	Grau de inchamento em etanol (%)	Densidade aparente (g/mL)	Diâmetro médio dos poros (Å)	Volume médio dos poros (cm ³ g ⁻¹)	Área específica (m ² g ⁻¹)
S1	50	0	0	0,25 ± 0,02	48	0,36	413
S2	100	0	0	0,28 ± 0,01	131	0,71	358
S3	150	0	0	0,26 ± 0,02	90	0,60	388

Legenda: S1, S2 e S3 correspondem aos suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnéticos obtidos.

Fonte: A autora, 2025.

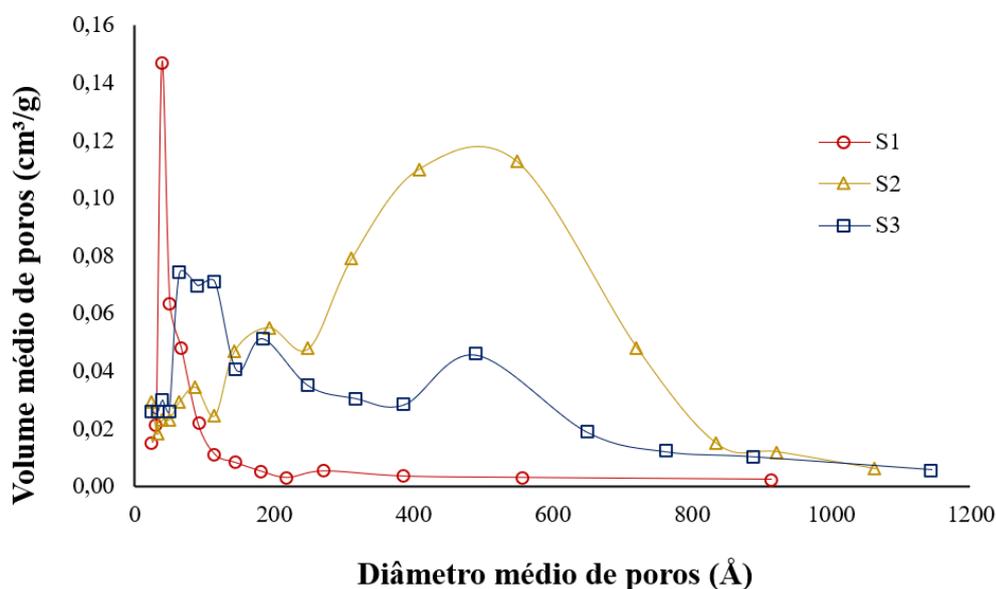
Figura 27 - Isotermas de adsorção e de dessorção de nitrogênio dos suportes magnéticos



Legenda: S1 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de *n*-heptano; S2 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano e S3 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de *n*-heptano.

Fonte: A autora, 2025.

Figura 28 - Distribuição dos tamanhos de poros dos suportes magnéticos



Legenda: S1 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de *n*-heptano; S2 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano e S3 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de *n*-heptano.

Fonte: A autora, 2025.

Conforme descrito na literatura, as isotermas de fisissorção características de partículas sólidas podem apresentar diferentes formatos, que classicamente são agrupados em seis tipos principais que podem ser associados à estrutura porosa das partículas analisadas (Ribeiro *et al.*, 2022; Torquato *et al.*, 2020; Sing, 1985). Como pode ser visto na Figura 27, as isotermas dos suportes magnéticos S1, S2 e S3 se assemelham a uma isoterma do tipo IV, frequentemente associada a sólidos mesoporosos (Ribeiro *et al.*, 2022; Teixeira; Coutinho; Gomes, 2001; Sing, 1985). Observa-se também que o fenômeno de histerese é mais acentuado para o suporte com poros menores (S1), pois ocorre uma maior diferença entre os processos de condensação e evaporação em comparação aos sólidos com poros de tamanhos maiores (Teixeira; Coutinho; Gomes, 2001; Sing, 1985).

A histerese entre as curvas de adsorção e de dessorção está associada à condensação capilar nas estruturas dos mesoporos (Santos *et al.*, 2021). De acordo com Sing *et al.* (1985) os loops de histerese podem exibir uma ampla variedade de formas, que variam em função do formato dos poros, sendo divididos em quatro tipos principais, H1, H2, H3 e H4. Analisando os perfis de isotermas dos suportes magnéticos obtidos nesta Dissertação, foi possível

classificar os perfis de loop de histerese como sendo do tipo H3 (ou tipo B) (considerado intermediário entre o tipo de histerese H1 e H4). Este tipo de loop de histerese é característico de agregados de partículas em forma de placa, dando origem a poros em forma de fenda (Ribeiro *et al.*, 2022; Santos *et al.*, 2021; Sing, 1985). Na Figura 28 é possível observar que o suporte S1 apresenta uma distribuição de poros mais estreita em comparação aos suportes S2 e S3, os resultados sugerem que o aumento do grau de diluição dos suportes promoveu um aumento da polidispersão do tamanho de poros, comportamento também observado no trabalho de Ribeiro *et al.* (2022).

A Tabela 6 mostra que o aumento do grau de diluição de 50 para 100 % (de S1 para S2) resultou em aumento do volume dos poros, aumento do diâmetro médio de poros e redução da área específica, conforme descrito por outros trabalhos na literatura (Ribeiro *et al.*, 2022; Coutinho; Cunha; Gomes, 2004; Coutinho; Souza; Gomes, 2004). Tendo em vista que o *n*-heptano possui baixa capacidade de solvatar as cadeias poliméricas em crescimento de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno), tende a formar polímeros com alto volume de poros (Gokmen; Du Prez, 2012; Sherrington, 1998).

De modo geral, quanto maior o grau de diluição dos monômeros no diluente, maior a porosidade dos materiais poliméricos (Rabelo; Coutinho, 1994a; Rabelo; Coutinho, 1994b; Rabelo, 1993), devido às maiores distâncias médias entre os aglomerados de núcleos primários e microsferas das cadeias poliméricas em crescimento (Okay, 2000). Comumente, espera-se que com o aumento do volume de poros ocorra um aumento da área específica dos suportes, porém o deslocamento do diâmetro de poros para poros maiores (Figura 28) promoveu a redução da área específica dos suportes magnéticos S2 em comparação aos S1, conforme mostrado na Tabela 6.

Em contrapartida, o aumento do grau de diluição de 100 para 150% (de S2 para S3) não resultou em aumento do volume de poros (Tabela 6) e deslocamento dos poros para maiores diâmetros (Figura 27), como seria o esperado. Este resultado pode estar relacionado ao fato das partículas dos suportes magnéticos S3 não serem esféricas, a morfologia irregular das partículas quebradiças pode ter comprometido os resultados do ASAP.

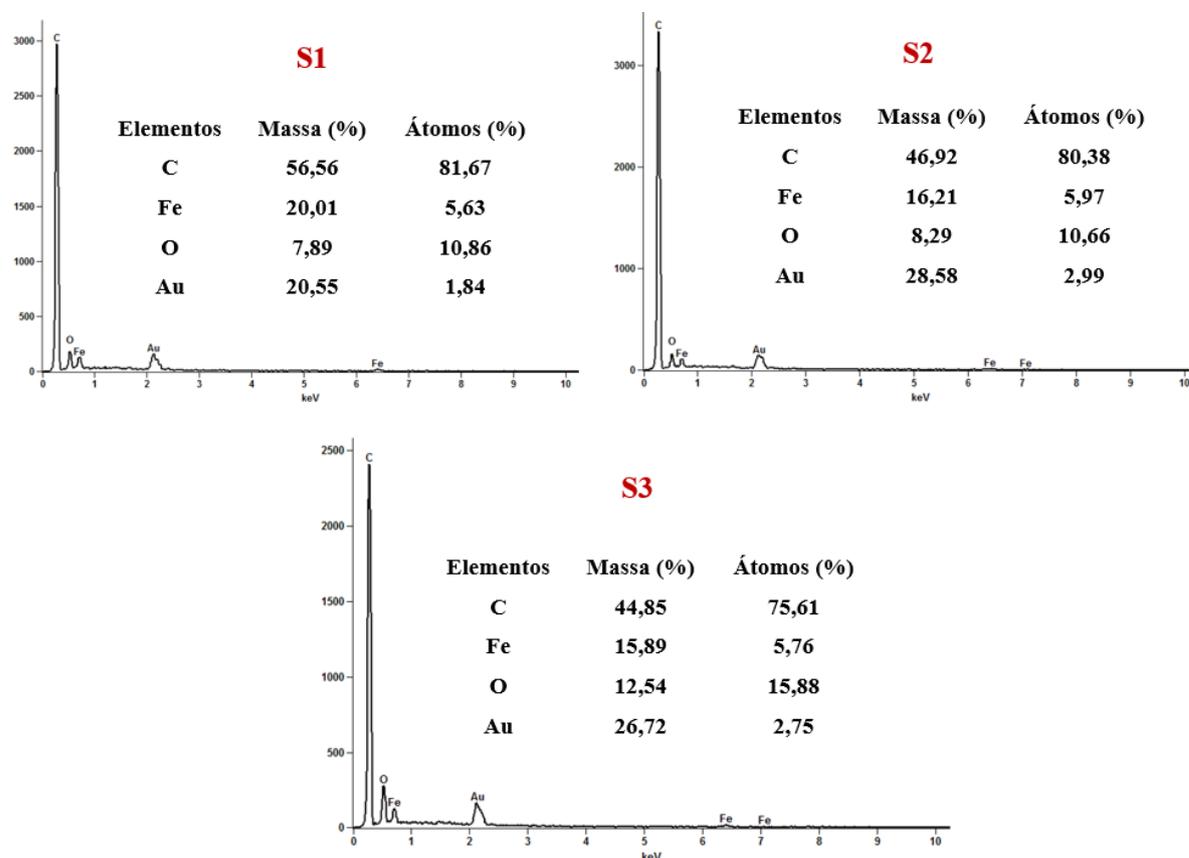
Os suportes magnéticos obtidos nesta Dissertação não apresentaram grau de inchamento em água e etanol como mostrado na Tabela 6. O grau de inchamento de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) (PS-DVB) pode ser ajustado variando a concentração do

DVB. Pequenas concentrações do agente reticulante em copolímeros de PS-DVB permitem que o material inche em bons solventes e não se dissolva neles. Porém, quanto maior o grau de reticulação de PS-DVB, maior a quantidade de ligações cruzadas na matriz polimérica e maior a resistência ao inchamento, mesmo em solventes quimicamente semelhantes (Okay, 2000). A água naturalmente não é um bom solvente para suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno), em função da natureza apolar desta matriz polimérica. O etanol pode apresentar certo grau de inchamento em copolímeros de PS-DVB com baixo grau de reticulação. Porém, os suportes magnéticos sintetizados nesta Dissertação apresentam 60% de DVB, o que justifica a resistência ao inchamento em etanol.

De modo geral, os polímeros porosos apresentam menor densidade em comparação a matriz polimérica não porosa devido aos espaços vazios presentes na estrutura polimérica seca. E por sua vez, quanto menor a densidade aparente, maior é a porosidade do material (Okay, 2000). Os suportes magnéticos sintetizados nesta Dissertação não apresentaram diferentes densidades aparentes (Tabela 6), apesar das diferentes porosidades entre eles, indicando que essas densidades foram afetadas pelo empacotamento de partículas irregulares com diferentes morfologias e faixas de distribuição de tamanho (Ribeiro *et al.*, 2022).

A espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS) estima a composição atômica dos materiais. A espectroscopia dos suportes magnéticos revelou o carbono como principal constituinte da matriz polimérica e átomos de ferro que indicam a incorporação da magnetita nos suportes magnéticos, corroborando com a coloração indicativa de impregnação da magnetita observada nas micrografias de OM. Os átomos de oxigênio presentes na espectroscopia podem ser provenientes da magnetita (Fe_3O_4), da umidade na amostra ou resquícios de ar atmosférico. Os átomos de ouro são decorrentes da metalização das amostras. A Figura 29 mostra a composição dos elementos analisados nos suportes magnéticos por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS).

Figura 29 – Composição dos elementos analisados nos suportes magnéticos por espectroscopia de raios X por energia dispersiva (EDS)

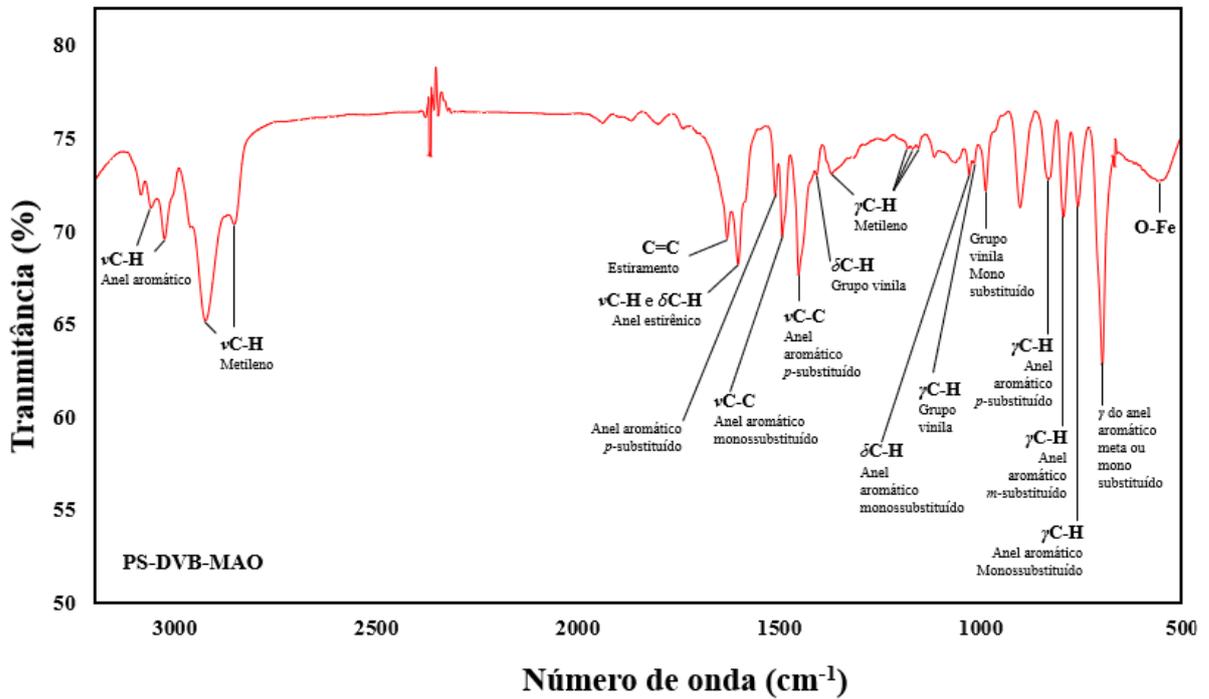


Legenda: S1 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de *n*-heptano; S2 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano e S3 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de *n*-heptano.

Fonte: A autora, 2025.

A Figura 30 mostra o espectro de FTIR dos suportes magnéticos obtidos. As bandas no espectro foram identificadas de acordo com os modos vibracionais e as estruturas químicas segundo Silverstein; Webster; Kiemle (2007). Os suportes magnéticos apresentaram nos espectros de FTIR as bandas características de PS-DVB, conforme outros trabalhos na literatura que caracterizaram poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) (Cunha *et al.*, 2025; Bento *et al.*, 2017). A presença da banda em 451 cm^{-1} corresponde ao modo de vibracional de estiramento da ligação O-Fe (Urian, 2021), o que indica a incorporação da magnetita nos suportes magnéticos, conforme outros trabalhos na literatura (Lourenço-Neto, 2024; Urian, 2021). Estes resultados corroboram com os resultados obtidos através da análise de EDS e das micrografias de OM. A Tabela 7 mostra os valores teóricos das bandas de absorção na região do infravermelho do poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) com magnetita.

Figura 30 - Espectro de FTIR dos suportes magnéticos obtidos



Legenda: PS-DVB-MAO - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético (S2).
 Fonte: A autora, 2025.

Tabela 7 - Valores teóricos das bandas de absorção na região do infravermelho de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) com magnetita

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo responsável
3025-3068	νC-H do anel aromático
2845-2948	νC-H de metileno
1934-1680	Sobreposição de bandas e combinações harmônicas de anéis meta e monossubstituídos
1630	νC=C de anel aromático
1600	νC-H e δC-H do anel estirênico
1509	Anel aromático <i>p</i> -substituído
1491	νC-C do anel aromático monossubstituído

1483-1487	ν C-C do anel aromático <i>p</i> -substituído
1409	δ C-H do grupo vinila
1151-1364	γ C-H de metileno
1027	δ C-H do anel aromático monossubstituído
1015-1019	γ C-H do grupo vinila
985	Grupo vinila monossubstituído
830	γ C-H do anel aromático <i>p</i> -substituído
795	γ C-H do anel aromático <i>m</i> -substituído
760	γ C-H do anel aromático monossubstituído
700	γ do anel aromático meta ou monossubstituído
451	ν O-Fe

Legenda: ν – estiramento; δ – deformação angular e γ – deformação angular fora do plano.

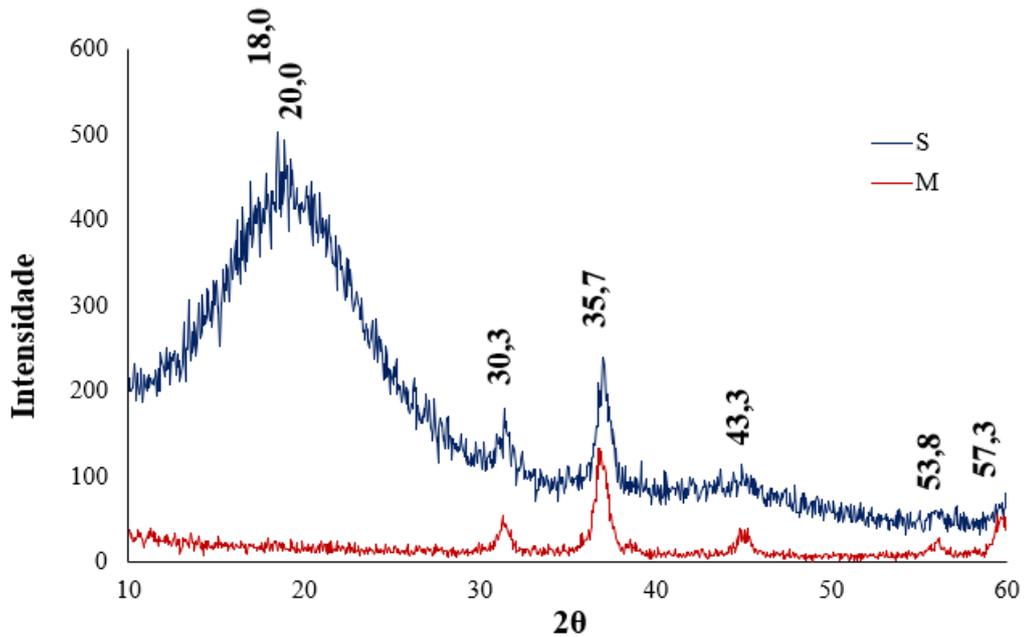
Fonte: Adaptado de Silverstein; Webster; Kiemle, 2007.

Os difratogramas de XRD obtidos para os suportes magnéticos revelaram raias correspondentes à magnetita nas posições 2θ de 30,2°; 35,5°; 43,2°; 53,6° e 57,3°. Os resultados são similares aos descritos em outros trabalhos que avaliaram amostras de magnetita e maghemita (Urian, 2021; Mendes *et al.*, 2019; Lobato; Mansur; Ferreira, 2017), o que confirma a incorporação da magnetita aos suportes magnéticos, corroborando com os resultados obtidos pelas análises de FTIR, EDS e micrografias de OM.

O difratograma dos suportes magnéticos revelou também uma raia larga que é resultado da estrutura amorfa do material polimérico que constitui os suportes magnéticos (Cullity, 1978), com picos típicos de amostras de polímeros com características de material amorfo nas posições 2θ de 18° e 20°, conforme verificado anteriormente por Bento *et al.* (2017) em amostras de PS-DVB magnéticas e Neves *et al.* (2011) em amostras de PS magnéticas. Comparando os difratogramas da magnetita e dos suportes magnéticos não foi possível observar mudanças na estrutura cristalina da magnetita durante o processo de

polimerização. O difratograma de raios-x da magnetita e dos suportes magnéticos pode ser visto na Figura 31.

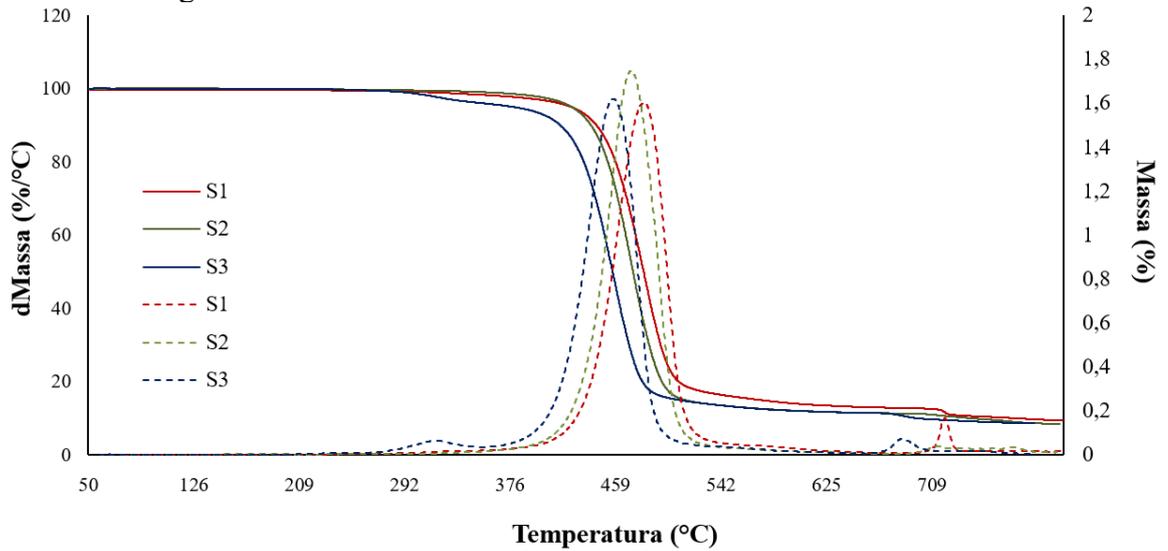
Figura 31 - Difratograma de raios X da magnetita (M) e dos suportes magnéticos (S)



Fonte: A autora, 2025.

A Figura 32 mostra as curvas de degradação térmica e derivada da perda de massa dos suportes magnéticos. A Tabela 8 apresenta as principais temperaturas de degradação coletadas nesta análise. A análise termogravimétrica dos suportes magnéticos (S1, S2 e S3) revelou que apesar das diferentes morfologias e porosidades, os suportes produzidos apresentam temperaturas de degradação próximas. Os suportes S1 e S2, preparados com 50% e 100% de grau de diluição respectivamente, apresentaram apenas um estágio de degradação, com o início da degradação térmica (T_{onset}) aproximadamente a 390 °C. O suporte S3, preparado com 150% de grau de diluição, apresentou o início da degradação térmica (T_{onset}) aproximadamente a 295 °C. A velocidade máxima de degradação ($T_{\text{máx}}$) diminuiu com o aumento do grau de diluição dos suportes magnéticos. Além disso, pode-se considerar a degradação total das cadeias poliméricas a aproximadamente 515 °C.

Figura 32 - Curvas de degradação térmica e derivada da perda de massa dos suportes magnéticos



Legenda: S1 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de *n*-heptano; S2 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano e S3 - Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% *n*-de heptano.

Fonte: A autora, 2025.

Tabela 8 - Temperaturas de degradação térmica dos suportes magnéticos

Suporte magnético	Grau de diluição em <i>n</i> -heptano (%)	Tonset ¹ (°C)	Tmáx ² (°C)	Teor de resíduo (%)
S1	50	390	475	9
S2	100	390	465	8
S3	150	295	455	9

Legenda: ¹ temperatura inicial de degradação térmica e ² temperatura em que a velocidade de degradação é máxima.

Fonte: A autora, 2025.

A resistência térmica dos suportes magnéticos produzidos pode ser conferida ao alto grau de agente reticulante empregado na síntese (60 % de DVB), pois, em geral, as ligações cruzadas conferem resistência mecânica e térmica à matriz polimérica (Formiga *et al.*, 2013; Machado; Lima; Pinto, 2007; Rabelo; Coutinho, 1994). Cunha *et al.* (2025) prepararam microesferas de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) sem magnetita com 25% de DVB por polimerização em suspensão aquosa. Obtiveram dois estágios de degradação térmica na análise termogravimétrica, o primeiro com T_{onset} a 145°C associado a evaporação da umidade na

amostra e o segundo com T_{onset} a 360°C associado a degradação da matriz polimérica e posterior decomposição da amostra. Formiga *et al.* (2013) prepararam copolímeros casca/núcleo (casca de PS-DVB e núcleo de PS-DVB com magnetita) e observaram que os suportes após a formação da casca, apresentaram tendência a maiores valores de $T_{\text{máx}}$ em comparação ao núcleo isolado. Propuseram que este comportamento ocorreu em virtude de a casca conter cerca de 35 % de DVB, tornando assim, os suportes casca/núcleo mais resistentes à degradação térmica quando comparados ao núcleo isolado, que contém apenas 5% de DVB.

A Tabela 8 mostra que com o aumento do grau de diluição de 50 para 100% (de S1 para S2) observou-se a diminuição da $T_{\text{máx}}$ dos suportes magnéticos. A Tabela 6 mostrou que S2 é mais poroso que S1. De modo geral, polímeros mais porosos podem apresentar menor T_{onset} e $T_{\text{máx}}$ em função de seus espaços vazios na estrutura polimérica. O suporte preparado com 150 % de grau de diluição (S3) apresentou menor T_{onset} e menor $T_{\text{máx}}$, em comparação aos demais suportes produzidos, contudo a Tabela 6 mostrou que S2 foi o suporte obtido mais poroso. A OM e o SEM revelaram que as partículas de S3 estão majoritariamente quebradas, ao passo que S2 apresenta partículas íntegras. O suporte S3 possivelmente demonstrou menor T_{onset} e menor $T_{\text{máx}}$ devido a estrutura quebradiça de suas partículas.

A termogravimetria não é uma técnica indicada para determinar com precisão a quantidade de magnetita incorporada nos suportes. Contudo, uma vez que a magnetita sintetizada não sofre degradação térmica nas condições de análise, é possível empregar o teor de resíduo (%) como uma comparação estimativa da incorporação de magnetita entre os suportes magnéticos obtidos nesta Dissertação. Os suportes S1, S2 e S3 apresentaram 9, 8 e 9 % de teor de resíduo respectivamente (Tabela 8). As variações de grau de diluição empregadas nesta Dissertação não parecem ter influenciado no percentual de magnetita incorporada nos suportes magnéticos, corroborando com os resultados percentuais de átomos de Fe presentes nas amostras de suporte magnético obtidos através do EDS.

Os dados obtidos através da análise de VSM revelam que a magnetização de saturação dos suportes magnéticos S1, S2 e S3 foi de 3,4, 3,3 e 3,5 emu/g respectivamente, indicando que os três suportes apresentaram capacidade semelhante de incorporação da magnetita. Estes resultados corroboram com o teor de resíduo (%) observado na análise termogravimétrica (TG) e com o percentual de átomos de Fe observados através da análise de EDS, ambos indicam que a incorporação da magnetita na matriz polimérica dos suportes magnéticos não sofreu influência da variação do grau de diluição dos monômeros no processo de polimerização por

semissuspensão aquosa, nas condições propostas nesta Dissertação. Os parâmetros obtidos pela análise de VSM dos suportes magnéticos podem ser vistos na Tabela 9.

Tabela 9 - Parâmetros obtidos pela análise de VSM dos suportes magnéticos

Amostra	Grau de diluição em <i>n</i> -heptano (%)	M_S (emu/g)	M_R (emu/g)	M_R/M_S	H_C (G)
S1	50	3,4	0,13	0,038	6,5
S2	100	3,3	0,13	0,039	15,2
S3	150	3,5	0,14	0,040	15,9

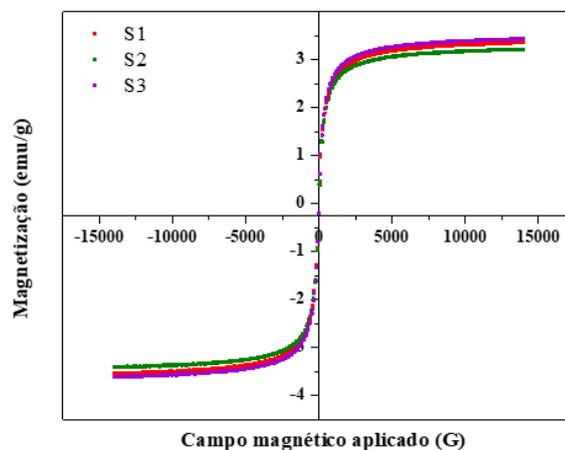
Legenda: M_S – Magnetização de saturação; M_R – Magnetização remanescente; M_R/M_S – Relação de remanescência; H_C – Força coerciva.

Fonte: A autora, 2025.

A redução da M_S dos suportes magnéticos em comparação à M_S da magnetita (61,68 emu/g) ou modificada com ácido oleico (47,62 emu/g) pode estar relacionada ao material polimérico que constitui os suportes. A determinação de M_S é feita em detrimento da massa da amostra, considerando que parte da massa das amostras corresponde ao material polimérico que não apresenta comportamento magnético, a redução de M_S dos suportes é esperada (Lobato; Mansur; Ferreira, 2017), conforme descrito por outros trabalhos na literatura (Lourenço-Neto, 2024; Costa *et al.*, 2019; Castanharo, 2015; Formiga *et al.*, 2013).

A ausência de ciclos de histerese e os valores de magnetização remanescente, da força coerciva e da relação de remanescência próximos de zero indicam que a capacidade superparamagnética da magnetita sintetizada foi mantida nos suportes magnéticos mesmo após sua incorporação na matriz polimérica (Lourenço-Neto, 2024; Castanho, 2015; Formiga *et al.*, 2013). A Figura 33 mostra as curvas de magnetização dos suportes magnéticos. Os resultados indicam que os suportes magnéticos apresentam comportamento de um material superparamagnético. Além disso, foi observado que os suportes magnéticos respondem ao campo de um ímã, conforme pode ser observado na Figura 34.

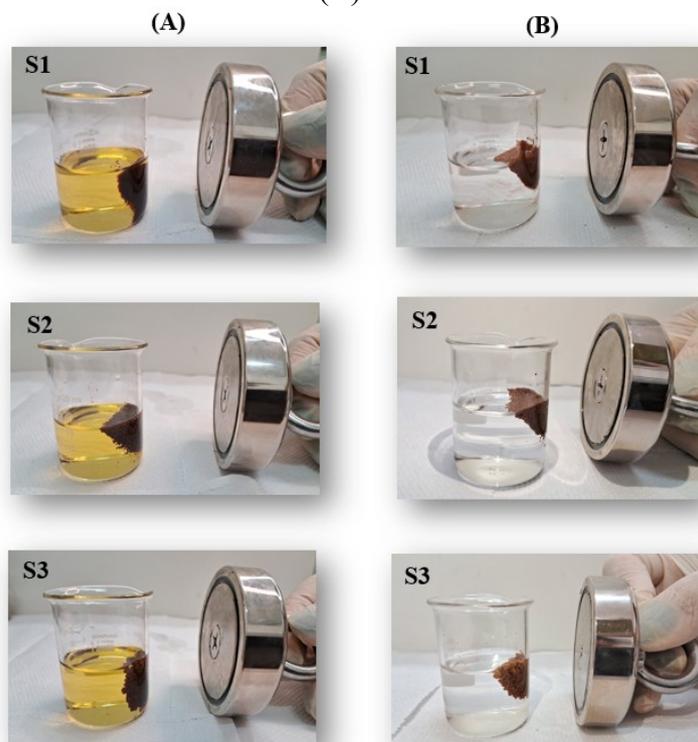
Figura 33 - Curvas de magnetização dos suportes magnéticos



Legenda: S1- Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de *n*-heptano; S2- Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano; S3- Poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de *n*-heptano.

Fonte: A autora, 2025.

Figura 34 - Comportamento dos suportes magnéticos na presença de um campo magnético em uma mistura de ácido oleico e etanol 1:2 (A) e solução aquosa de fosfato de sódio 5 mM (B)



Legenda: S1 - poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético /50% de *n*-heptano; S2 - poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético /100% de *n*-heptano; S3 - poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético /150% de *n*-heptano.

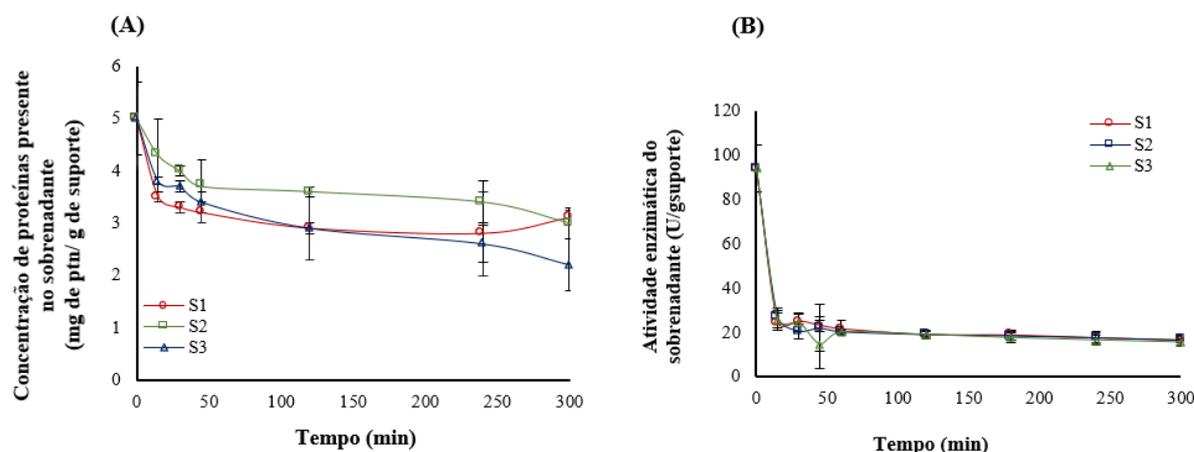
Fonte: A autora, 2025.

4.3 Caracterização dos biocatalisadores magnéticos

Os suportes magnéticos sintetizados neste estudo S1, S2 e S3, preparados por polimerização em semissuspensão aquosa variando grau de diluição do diluente *n*-heptano em 50, 100 e 150%, respectivamente, foram empregados para a imobilização da enzima comercial lipase B de *Candida antarctica* (Lipozyme® CALB), com a finalidade de desenvolver biocatalisadores magnéticos. Estes biocatalisadores foram denominados BioS1, BioS2 e BioS3, respectivamente. Os parâmetros de imobilização e a atividade em reações de hidrólise e esterificação foram avaliados.

A Figura 35 (A) mostra a redução da concentração de proteínas no sobrenadante ao longo do processo de imobilização enzimática nos suportes magnéticos. A Figura 35 (B) mostra a redução da atividade hidrolítica no sobrenadante ao longo do processo de imobilização enzimática nos suportes. Esta redução da atividade hidrolítica do meio e da concentração de proteínas do sobrenadante no processo de imobilização indica a adsorção das enzimas aos suportes. Estudos controle foram realizados com a solução enzimática sem a adição dos suportes nas mesmas condições empregadas no processo de imobilização. Nestes experimentos controle na ausência dos suportes não foi possível observar variação da concentração de proteínas e atividade hidrolítica do meio, indicando que o meio reacional não provocou a inativação das enzimas, sugerindo que o decaimento da atividade enzimática do sobrenadante está relacionado a interação deste com o suporte. Observou-se que a maior diminuição de atividade e concentração de proteínas do sobrenadante ocorreu nos primeiros 15 minutos de imobilização para ambos os suportes (Figura 35), o que também foi observado em outros trabalhos na literatura (Ribeiro *et al.*, 2022; Pinto, 2017).

Figura 35 - Cinética de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* em suportes magnéticos baseada na quantidade de proteína presente no sobrenadante ao longo da imobilização (A) e na atividade hidrolítica do sobrenadante ao longo do processo de imobilização (B)



Legenda: S1 – poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético / 50% de *n*-heptano; S2 – poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de *n*-heptano e S3 – poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de *n*-heptano.

Fonte: A autora, 2025.

A Tabela 10 mostra os dados relacionados aos parâmetros de imobilização, atividades enzimáticas e conversão do ácido oleico em oleato de etila dos biocatalisadores magnéticos obtidos. É possível notar que apesar das diferentes áreas específicas, diâmetros e volumes de poros dos suportes magnéticos produzidos, mostrados na seção anterior (Tabela 6), não houve variação de rendimento de imobilização (%) e de carga enzimática adsorvida (mg/mL) entre os suportes (Tabela 10). Ribeiro *et al.* (2022) prepararam biocatalisadores a partir da imobilização de CALB em suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) e poli(clorometilostireno-*co*-divinilbenzeno) obtidos por polimerização em suspensão aquosa. Os autores demonstraram que o diâmetro dos poros teve maiores influências para os valores de rendimento de imobilização do que a área específica dos suportes e explicaram que diâmetros de poro maiores podem favorecer o acesso da solução enzimática na estrutura porosa interna das partículas de suporte.

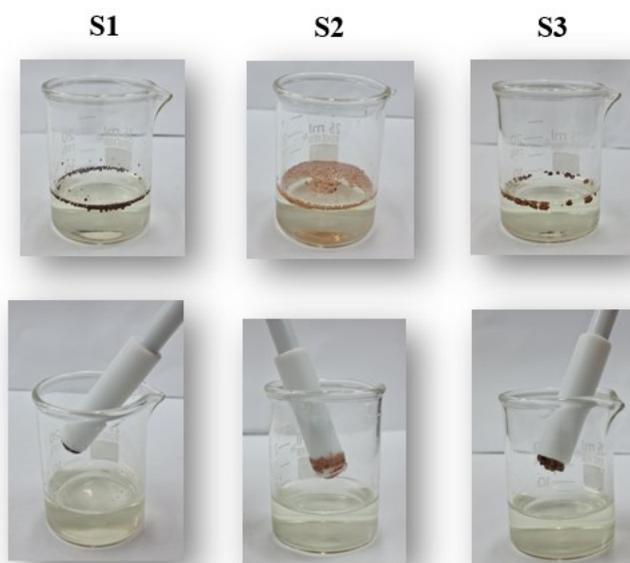
Por outro lado, Pinto *et al.* (2020a) mostraram que suportes de PS/ PS-DVB e PS/PS com a mesma composição de comonômeros, de morfologia núcleo/casca, obtidos por uma combinação de polimerização em suspensão e polimerização em emulsão, com diferentes áreas específicas (18,3 e 1,6 m²g⁻¹ respectivamente) e diâmetros de poros (217,8 e 357,5 Å respectivamente) forneceram valores próximos de rendimento de imobilização (80 e 82 %). Em

outro trabalho, Pinto; Freire; Pinto (2014) obtiveram suportes porosos núcleo/casca de PS/PS com diferentes morfologias e observaram que mesmo os suportes com áreas específicas menores ($2,9 - 13 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) apresentaram rendimentos de imobilização da CALB semelhantes aos suportes com maiores áreas específicas ($27,3 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$). Os autores atribuíram esse comportamento à difusão irrestrita das enzimas na estrutura porosa interna das partículas devido aos diâmetros de poros relativamente altos dos materiais poliméricos mesoporosos e macroporosos e às pequenas dimensões da CALB, de aproximadamente $30\text{Å} \times 40\text{Å} \times 50\text{Å}$, massa molecular de cerca de 33 KDa (Strelczyk *et al.*, 2016, Uppenberg *et al.*, 1994).

Nesta dissertação, considerando que os suportes e diâmetro de poros variando de 48 a 131 Å e que a CALB apresenta um diâmetro esférico médio de aproximadamente 39 Å (Pedro *et al.*, 2023; Macario *et al.*, 2005; Dumitriu *et al.*, 2003), é possível supor que o acesso da solução enzimática não tenha sido desfavorecido pela estrutura de um suporte em comparação ao outro. Neste caso, as concentrações iniciais de enzimas na solução de imobilização poderiam exercer maior influência nos parâmetros de imobilização (Ribeiro *et al.*, 2022), ou seja, diferentes concentrações de enzima na solução do processo de imobilização poderiam gerar diferentes rendimentos de imobilização (%) e cargas enzimáticas adsorvidas (mg/mL). Isto porque as diferentes áreas específicas (variando de 413 a $358 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) tendem a permitir diferentes cargas enzimáticas adsorvidas máximas nos suportes (quantidade máxima de enzima adsorvida ao suporte sem perda de atividade por sobreposição de enzimas), conforme relatado por Bento *et al.* (2017).

Conforme mostrado na Tabela 10, as atividades hidrolíticas também não variaram para todos os biocatalisadores obtidos (BioS1, BioS2 e BioS3) e foram inferiores em comparação às atividades de esterificação. Este comportamento era esperado, pois a CALB é uma enzima empregada preferencialmente em sínteses orgânicas, apresentando atividades melhores em reações de esterificação conforme relatado por outros trabalhos na literatura (RIBEIRO *et al.*, 2022; Pinto *et al.*, 2020a; Pinto *et al.*, 2018; Pinto, 2017; Pinto; FREIRE; Pinto, 2014). Vale mencionar que ao final das reações de hidrólise os biocatalisadores foram recuperados magneticamente conforme ilustrado na Figura 36.

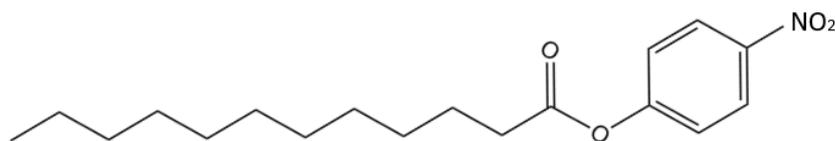
Figura 36 - Recuperação dos biocatalisadores ao final da reação de hidrólise: (A) BioS1, (B) BioS2 e (C) BioS3



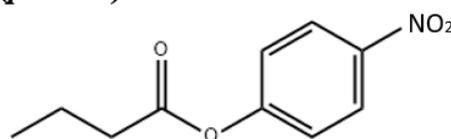
Fonte: A autora, 2025.

Cunha *et al.* (2014) prepararam biocatalisadores à base de CALB imobilizada em suportes núcleo/casca PS-DVB/ PS-DVB com diferentes áreas específicas e diâmetros de poros e observaram que a área específica teve uma influência mais forte na atividade hidrolítica dos biocatalisadores do que o diâmetro dos poros. Contudo, nesta Dissertação não foi observada diferença de atividade hidrolítica entre os biocatalisadores. É plausível supor que o substrato *p*-NFL tenha acessado apenas às enzimas imobilizadas na superfície externa das partículas e esta área específica externa pode provavelmente ser parecida para os diferentes suportes. A Figura 37 mostra a estrutura química dos substratos *p*-NFL e *p*-NFB.

Figura 37 - Estrutura química dos substratos *p*-NFL e *p*-NFB



Laurato de *p*-nitrofenila (*p*-NFL)



Butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB)

Fonte: A autora, 2025.

Muitos trabalhos na literatura descreveram lipases com resultados de atividade hidrolítica melhores para o substrato *p*-NFL em comparação ao butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NFB) (Fé *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2014; Sarkar *et al.*; Rigo *et al.*, 2012). Fé *et al.* (2024) afirmaram que isto ocorre porque a lipase imobilizada em uma conformação que favorece o acesso de substratos maiores. Por outro lado, Cipolatti *et al.* (2018) prepararam suportes de poli(metacrilato de metila) e poli(metacrilato de metila-*co*-divinilbenzeno) variando o teor de DVB e poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) para a imobilização de CALB. Mostraram que os biocatalisadores preparados a partir de poli(metacrilato de metila), polímero que apresentou menor ângulo de contato, indicando maior polaridade, apresentaram melhores resultados de atividade hidrolítica e propuseram que o substrato *p*-NFL difunde melhor através dos poros de suportes com superfícies ligeiramente mais polares (Cipolatti *et al.*, 2018).

Fé *et al.* (2024) prepararam suportes de poli(metacrilato de metila), poli(metacrilato de metila-*co*-divinilbenzeno) e poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) para a imobilização de lipase de *Rhizomucor miehei* (RML). Descreveram que o biocatalisador de hidrofilicidade intermediária, apresentou melhores resultados para a hidrólise do *p*-NFL. Foi proposto que a hidrofilicidade intermediária do poli(metacrilato de metila-*co*-divinilbenzeno) permitiu melhor difusão de *p*-NFL, em comparação ao poli(metacrilato de metila) (menos hidrofóbico) e ao poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) (mais hidrofóbico). A hidrofilicidade/hidrofobicidade dos suportes não teve um efeito tão pronunciado quando utilizado o *p*-NFB (Fé *et al.*, 2024). Nesta Dissertação, a baixa atividade hidrolítica, observada nos biocatalisadores magnéticos

preparados pode ter alguma relação com a alta hidrofobicidade dos suportes, que por sua vez podem não estar permitindo uma adequada difusão da solução aquosa de *p*-NFL.

A Tabela 10 mostra as atividades de esterificação (U/g_{bio}) e conversão de ácido oleico em oleato de etila (%) dos biocatalisadores magnéticos obtidos. Apesar de apresentarem o mesmo rendimento de imobilização (%) e carga enzimática adsorvida (mg/mL), o biocatalisador BioS3 apresentou uma atividade de esterificação maior em comparação ao BioS1 e ao BioS2. O biocatalisador BioS1 alcançou percentuais de conversão na síntese do oleato de etila inferiores em comparação aos demais.

A atividade de esterificação (U/g_{bio}) é um valor relacionado a quantidade de produtos formados nos primeiros minutos de reação, para esta Dissertação foram considerados os primeiros 15 min reacionais. A conversão consiste no percentual de substrato convertidos em produtos, nesta Dissertação foram considerados 24 h reacionais. O biocatalisador BioS3 apresentou atividade de esterificação superior ao BioS1 e BioS2, contudo alcançou um percentual de conversão na síntese de oleato de etila semelhante à de BioS2. Estes resultados revelam que BioS3 apresenta um início de catálise mais rápido em comparação aos demais biocatalisadores, contudo, atinge o mesmo percentual de conversão de substratos em produtos que BioS2 em 24 h de reação.

Este comportamento pode indicar que a estrutura quebrada do suporte S3, preparado empregando 150% de diluição em *n*-heptano, pode estar favorecendo o acesso dos substratos (ácido oleico e etanol) à estrutura interna dos suportes e com isso, possibilitando que a catálise ocorra mais rapidamente. As partículas quebradas de S3 podem apresentar limitações de difusão do ácido oleico e do oleato de etila menores em comparação às partículas íntegras de S1 e S2, uma vez que as partículas quebradas podem permitir um acesso mais rápido às enzimas imobilizadas no interior dos suportes, o que pode justificar a maior atividade de esterificação de S3.

A baixa conversão do ácido oleico em oleato de etila (%) observada para o biocatalisador BioS1, em comparação ao BioS2 e BioS3, pode estar associada à porosidade do suporte S1 que é menor em comparação aos suportes S2 e S3 (empregados para a preparação de BioS2 e BioS3, respectivamente). A menor porosidade de S1 pode estar desfavorecendo a difusão de substratos e produtos através dos poros. Outros trabalhos na literatura descreveram que as limitações de transferência de massa exercem grande influência no procedimento de

imobilização e desempenho final do biocatalisador (Ribeiro *et al.*, 2022; Cipolatti *et al.*, 2019; Cunha *et al.*, 2014). Por isso, é plausível supor que a estrutura do suporte S1 possa estar desfavorecendo a transferência de massa de substratos e produtos do biocatalisador BioS1, resultando em uma restrição de acesso do substrato (ácido oleico) aos sítios ativos das enzimas imobilizadas e conseqüentemente, em menor conversão de substratos em produtos.

Tabela 10 - Parâmetros de imobilização, atividades enzimáticas e conversão de oleato de etila dos biocatalisadores magnéticos obtidos

Amostra	Ue (U/g _{suporte})	Uteo (U/g _{suporte})	Rendimento de imobilização (%)	Concentração de proteína inicial (mg/g _{suporte})	Concentração de proteínas retida no suporte (mg/g _{suporte})	Atividade de hidrólise do biocatalisador (U/g _{bio}) ³	Atividade de esterificação do biocatalisador (U/g _{bio}) ²	Conversão do oleato de etila (%) ¹
BioS1	94 ± 10	77 ± 13	82 ± 4	5,0 ± 0,7	1,9 ± 0,15	1,3 ± 0,3	477 ± 69	30 ± 6
BioS2	94 ± 10	77 ± 13	81 ± 5	5,0 ± 0,7	2,0 ± 0,34	1,3 ± 0,2	493 ± 9	63 ± 10
BioS3	94 ± 10	78 ± 12	83 ± 3	5,0 ± 0,7	3,0 ± 0,7	1,5 ± 0,4	716 ± 84	66 ± 5

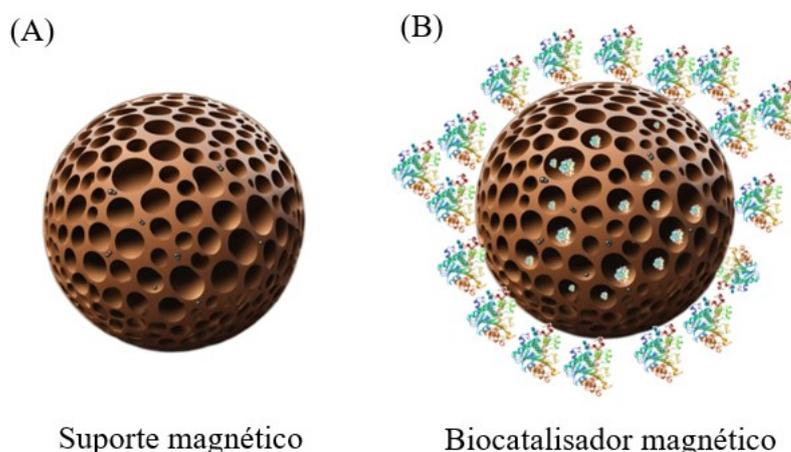
Legenda: BioS1 – poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 50% de diluição em *n*-heptano; BioS2 – poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 100% de diluição em *n*-heptano; BioS3 – poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnético/ 150% de diluição em *n*-heptano; Ue – Atividade hidrolítica do sobrenadante antes de iniciar a imobilização e Uteo – Atividade hidrolítica teoricamente adsorvida ao suporte.

Nota: ¹A conversão (%) e a ²atividade de esterificação (U/g_{bio}) foram determinadas através da esterificação do oleato de etila. A ³atividade de hidrólise foi determinada através da hidrólise do laurato de *p*-nitrofenila.

Fonte: A autora, 2025.

O biocatalisador BioS2 foi escolhido para ser utilizado nos estudos que serão discutidos posteriormente, pois o suporte S2 (empregado para preparar o biocatalisador BioS2) foi o único que apresentou morfologia regular esférica, além de melhor integridade estrutural e maior volume e diâmetro de poros, em comparação aos demais suportes (S1 e S3). A Figura 38 mostra uma ilustração do suporte S2 (A) e do biocatalisador BioS2 (B), respectivamente.

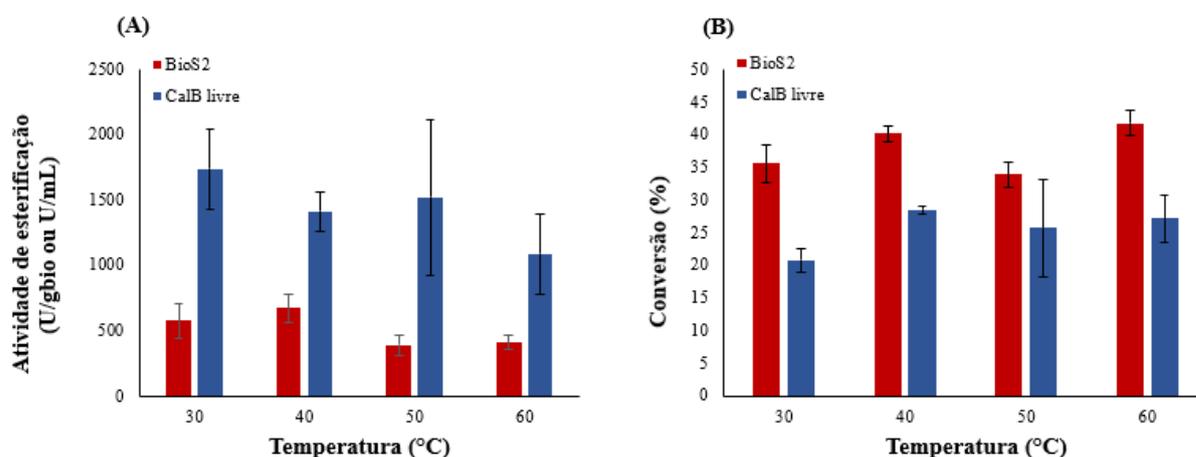
Figura 38 - Ilustração do suporte S2 (A) e do biocatalisador BioS2 (B)



Fonte: A autora, 2025.

Um estudo de avaliação da influência da temperatura sobre a atividade de esterificação e percentual de conversão de ácido oleico em oleato de etila foi conduzido empregando o BioS2 e a CALB livre. A Figura 39 mostra o gráfico de influência da temperatura na atividade de esterificação e conversão do ácido oleico em oleato de etila. Comparando a atividade de esterificação da CALB livre e do biocatalisador BioS2 (Figura 39, A), foi possível observar que as atividades de esterificação da CALB livre se mostraram superiores a atividade da enzima imobilizada (considerando 15 min de reação) em todas as temperaturas avaliadas no estudo (30, 40, 50 e 60 °C).

Figura 39 - Influência da temperatura na atividade de esterificação e conversão do ácido oleico em oleato de etila. Biocatalisador preparado a partir do suporte magnético S2 e CALB livre – Enzima comercial Lipozyme® CALB (novozymes)



Fonte: A autora, 2025.

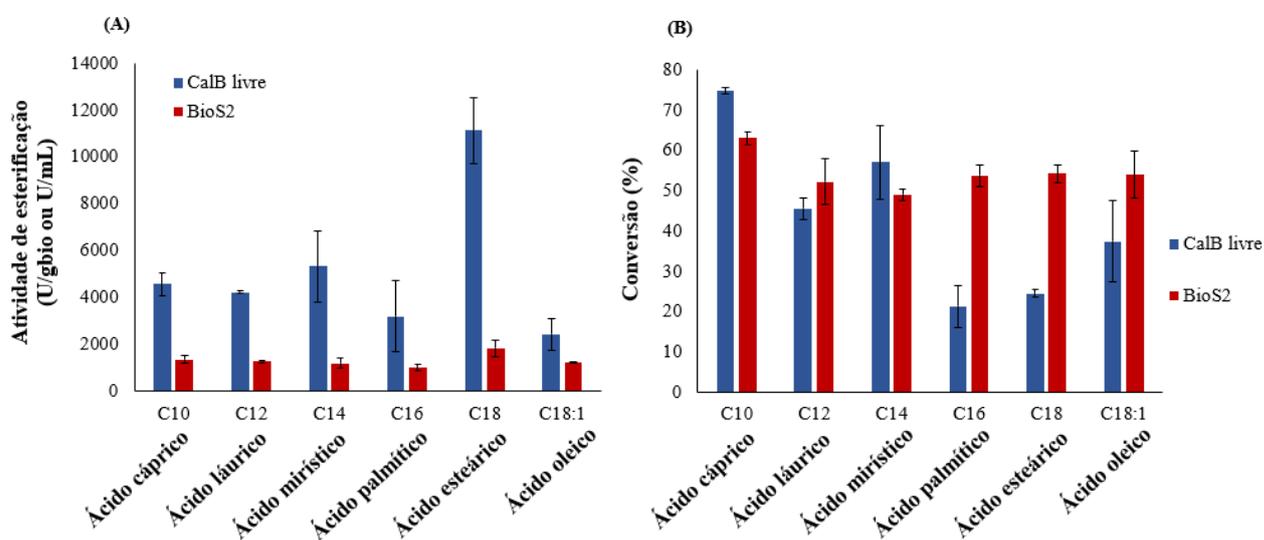
De modo geral, limitações de difusão e transferência de massa de substratos e produtos são esperadas com a imobilização das enzimas em suportes porosos, consequentemente afetando o desempenho dos biocatalisadores imobilizados em comparação às enzimas livres (Pinto *et al.*, 2020a). Contudo, comparando a conversão do ácido oleico em oleato de etila da CALB livre e do biocatalisador BioS2 (Figura 39, B) foi possível observar que apesar das atividades de esterificação da CALB livre terem sido maiores, a conversão do ácido oleico em oleato de etila (considerando 24 h de reação) foi superior para o biocatalisador BioS2 em todas as temperaturas avaliadas no estudo.

Pedro *et al.* (2023) imobilizaram CALB em suportes micro e mesoporosos à base de sílica não magnética. Investigaram o efeito das temperaturas de 30, 40, 50, 60 e 75 °C na síntese de oleato de etila comparando a CALB livre e com a CALB imobilizada obtida. Observaram maiores conversões de oleato de etila para os biocatalisadores imobilizados em todas as temperaturas estudadas, em comparação a enzima livre. Sugeriram que a imobilização melhorou a estabilidade térmica do biocatalisador e que este comportamento pode estar relacionado a uma interação mais forte entre a enzima e o suporte, que por sua vez, promove uma redução na mobilidade da estrutura terciária da lipase, possivelmente protegendo-a dos efeitos desnaturantes causados pela temperatura e pelo contato com o meio de reação.

De modo geral, a imobilização pode alterar as propriedades bioquímicas das enzimas, “protegê-las” do ambiente externo e modificar o desempenho do biocatalisador (Fé *et al.*, 2024). Nesta Dissertação, a estrutura do suporte S2 parece garantir às enzimas imobilizadas uma proteção do ambiente externo que provavelmente é mais pronunciada considerando 24 h de reação. A hipótese é que a exposição da enzima livre ao ambiente reacional à longo prazo pode ter afetado sua estrutura refletindo em menor conversão de substratos em produtos. A imobilização da lipase no suporte S2 pode ter conferido estabilidade térmica a enzima, garantido maiores conversões do ácido oleico em oleato de etila em todas as temperaturas testadas.

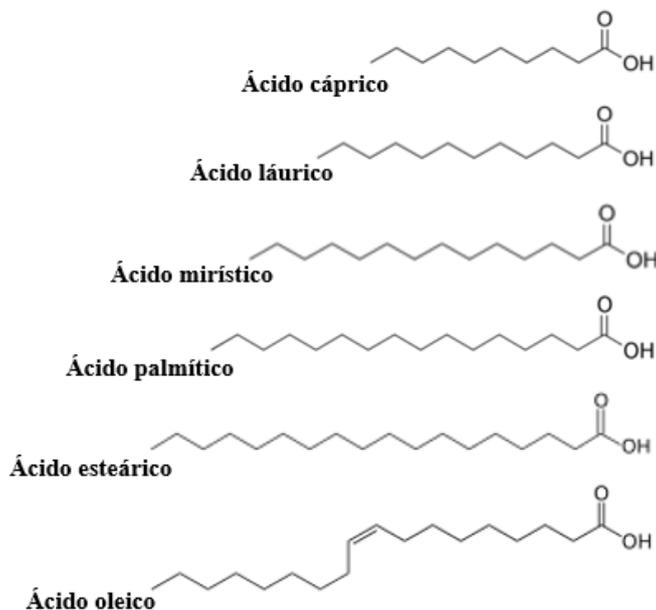
Um estudo de avaliação da influência do tamanho de cadeia dos ácidos graxos sobre a atividade de esterificação e percentual de conversão de substratos em produtos foi conduzido empregando o BioS2 e a CALB livre. Na Figura 40 (A) é possível observar que a CALB livre apresentou atividades de esterificação superiores em comparação ao biocatalisador BioS2 para todos os ácidos graxos empregados neste estudo. Contudo, a Figura 40 (B) mostra que o biocatalisador BioS2 alcançou melhores resultados de conversão de substratos em produtos (%) para os ácidos palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), esteárico ($C_{18}H_{36}O_2$) e oleico ($C_{18}H_{34}O_2$), em comparação a CALB livre, que apresentou melhor conversão (%) para o ácido cáprico ($C_{10}H_{20}O_2$). A Figura 41 mostra a estrutura química dos ácidos graxos empregados neste estudo.

Figura 40 - Atividade de esterificação e conversão de ácidos graxos com diferentes tamanhos de cadeia. Biocatalisador preparado a partir do suporte magnético S2 e CALB livre – Enzima comercial Lipozyme® CALB (novozymes)



Fonte: A autora, 2025.

Figura 41 - Estrutura química dos ácidos graxos utilizados



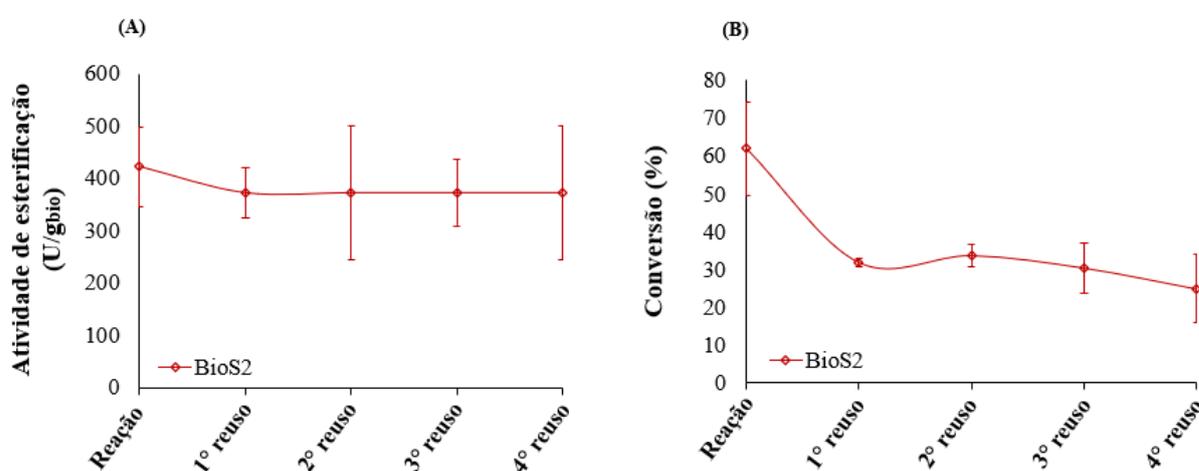
Fonte: A autora, 2025.

Alguns trabalhos na literatura descrevem que a especificidade para ácidos graxos com menores tamanhos de cadeia carbônica pode estar associada ao tamanho do bolso catalítico da CALB, promovendo que substratos menores tenham melhor acesso ao sítio ativo (Kuroiwa *et al.*, 2024; Ortiz *et al.*, 2019; Zisis *et al.*, 2015; Stauch; Fisher; Cianci, 2015). Os resultados sugerem que a imobilização da enzima no suporte S2 melhorou a conversão de ácidos graxos com maiores tamanhos de cadeia carbônica. A hipótese é que a imobilização afetou a estrutura do bolso catalítico das enzimas, possibilitando maior exposição do sítio ativo e consequentemente, favorecendo o acesso de substratos com maiores tamanhos de cadeia carbônica.

Uma das principais vantagens da utilização de biocatalisadores imobilizados é a possibilidade de reutilização da enzima em outro sistema catalítico (Sikora *et al.*, 2017). A Figura 42 mostra o reuso do biocatalisador BioS2. A atividade de esterificação (U/g_{bio}) e a conversão do ácido oleico em oleato de etila (%) do biocatalisador BioS2 foi avaliada em cinco ciclos de utilização. É possível observar na Figura 42 (A) que o biocatalisador BioS2 manteve sua atividade de esterificação em cinco ciclos de uso. Outros trabalhos na literatura obtiveram resultados semelhantes (Silva *et al.*, 2018; Bento *et al.*, 2017; Sugahara; Varéa, 2014). Contudo,

na Figura 42 (B) é possível observar que a conversão do ácido oleico em oleato de etila reduziu em aproximadamente 50% do primeiro para o segundo uso e em seguida, a conversão se manteve pelos próximos três ciclos. Ou seja, o biocatalisador manteve 50% da sua conversão de ácido oleico em oleato de etila (%) por cinco ciclos de uso. Este comportamento foi observado para outros biocatalisadores à base de lipases na literatura (Pedro *et al.*, 2023; Aguierras *et al.*, 2013; Ghamgui *et al.*, 2004; Watanabe *et al.*, 2002).

Figura 42 - Reuso do biocatalisador (BioS2)



Fonte: A autora, 2025.

Bento *et al.* (2017) mostram que a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético não apresentou perda estatística significativa de atividade de esterificação após sete reações consecutivas de esterificação do ácido butírico com butanol, em batelada. Silva *et al.* (2018) relataram que o biocatalisador à base de lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético também não apresentou perda considerável de atividade após sete reações consecutivas de transesterificação do óleo de coco. Estes resultados estão de acordo com o observado nesta Dissertação.

Em contrapartida, Torquato *et al.* (2025) mostraram que o biocatalisador à base de lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) não magnético apresentou uma redução de 25% na atividade de esterificação após o primeiro ciclo de reuso. Depois, o biocatalisador pôde ser usado em outros dois ciclos sem perda significativa

da atividade de esterificação na reação de esterificação de ácido oleico e etanol (1:1) e após o quarto ciclo de reuso, a perda da atividade de esterificação foi igual a 81%. Propuseram que este resultado indica a possibilidade de redução do custo total do processo ao aplicar este biocatalisador em larga escala, em comparação à enzima livre.

Quanto a avaliação do reuso por percentual de conversão de substratos em produtos, Cipolatti *et al.* (2021) imobilizaram lipase B recombinante de *Candida antarctica* (LIPB) em diferentes partículas de sílica mesoporosa não magnética e obtiveram 43,5% de conversão do acetato de vinila em 24 h de reação. O percentual de conversão se manteve por 10 ciclos de uso. Por outro lado, Pedro *et al.* (2023) imobilizaram CALB e RML (lipase de *Rhizomucor miehei*) em suportes micro e mesoporosos à base de sílica não magnética. Observaram que ambos os biocatalisadores mantiveram apenas 30% da conversão inicial após 3 reusos na síntese de oleato de etila e sugeriram que este comportamento pode estar relacionado à dessorção ou desnaturação da lipase.

As lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos têm o centro ativo mais exposto ao meio (Pedro *et al.*, 2023) e por isso, podem ser mais rapidamente inibidos pelos reagentes (Rodrigues *et al.*, 2019). José *et al.* (2011) observaram uma alteração estrutural secundária na CALB comercial (Novozym®435) após contato com etanol. Os solventes polares podem distorcer a molécula da enzima removendo a água na microcamada que envolve o biocatalisador (Aguieiras *et al.*, 2013; Stergiou *et al.*, 2013; Bezbradica *et al.*, 2007). De modo geral, a imobilização em suportes hidrofóbicos é forte, mas as lipases podem ser dessorvidas de acordo com as condições de reação (Pedro *et al.*, 2023).

Nesta Dissertação, a diminuição do percentual de conversão de oleato de etila do primeiro para o segundo uso pode estar associada à inibição da enzima pelo contato com o etanol em excesso presente no meio reacional (ácido oleico e etanol, 1:2) ou à dessorção das enzimas imobilizadas na superfície externa dos suportes, uma vez que estudos mostram que as lipases imobilizadas na superfície interna dos poros dos suportes estão geralmente menos sujeitas à lixiviação (Rodrigues *et al.*, 2019).

Vale mencionar que, após cada ciclo de utilização o biocatalisador obtido nesta Dissertação foi recuperado via campo magnético, empregando um ímã de 80 Kg de tração, sem perda aparente do biocatalisador magnético. O biocatalisador obtido pôde ser facilmente lavado duas vezes com água destilada e uma vez com etanol 70% dentro do frasco de reação, o que

simplificou a reutilização, que por sua vez, consistiu apenas na adição dos substratos (ácido oleico e etanol 1:2) no frasco reacional que continha o biocatalisador magnético. Torquato *et al.* (2025) descreveram o meio reacional constituído por ácido oleico e etanol (1:1) como um meio de reação viscoso e a recuperação do biocatalisador à base de CALB imobilizada em poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) não magnético como um processo complexo. Propuseram que o acúmulo do éster de oleato de etila no suporte dificulta a lavagem do biocatalisador e a recuperação da enzima pelo processo de filtração.

A estabilidade da interação entre a enzima e o suporte foi avaliada por meio da agitação vigorosa (200 rpm) por 30 min de BioS2 em solução contendo o surfactante Triton-X. As alíquotas do sobrenadante do procedimento de dessorção não apresentaram atividade hidrolítica. A ausência de atividade hidrolítica das alíquotas do sobrenadante pode estar associada a diluição da concentração de enzimas no meio, dessa maneira as alíquotas são apresentadas com concentração enzimática suficiente no meio para a avaliação da atividade hidrolítica pela metodologia proposta nesta Dissertação.

O biocatalisador BioS2 apresentou uma atividade de esterificação de $520,9 \pm 98,4$ U/g_{bio} (em 15 min de reação) e uma conversão do ácido oleico em oleato de etila de $14,6 \pm 2,9$ % (em 24 h de reação) após o tratamento com o surfactante. Os resultados refletem uma forte interação entre as enzimas e o suporte, uma vez que mesmo depois do contato com o surfactante, BioS2 permaneceu com atividade e percentual de conversão. Outros ciclos de contato com o surfactante, até a total dessorção das enzimas, seriam importantes para determinar o perfil de interação entre a CALB e o suporte obtido nesta Dissertação (S2). Um estudo mais aprofundado sobre a interação da CALB com os suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnéticos é indicado para trabalhos futuros a fim de contribuir com a compreensão da estabilidade destes biocatalisadores heterogêneos.

Os novos biocatalisadores magnéticos obtidos nesta Dissertação apresentaram características de recuperação e reuso, e resultados de atividade e percentual de conversão de ácidos graxos alifáticos em ésteres etílicos que sugerem seu potencial operacional e catalítico, respectivamente, para diferentes reações de esterificação de interesse comercial. Os resultados indicam que o emprego do biocatalisador magnético obtido em larga escala pode possibilitar a redução dos custos totais de um processo de produção, em comparação ao emprego da enzima livre. Considerando o potencial dos biocatalisadores magnéticos, estudos futuros propondo equipamentos e sistemas operacionais para a implementação desta tecnologia na indústria serão

importantes para compreender as vantagens e limitações deste processo em larga escala, a fim de direcionar os estudos subsequentes de aprimoramento dos biocatalisadores magnéticos de acordo com as características necessárias para o emprego em escala industrial.

Um estudo futuro variando a concentração de enzimas da solução enzimática empregada no processo de imobilização seria relevante para determinar o limite de carga enzimática adsorvida sem perda de atividade em cada suporte magnético obtido nesta Dissertação. Sendo importante determinar o rendimento máximo de imobilização de cada suporte obtido para avaliar como estes parâmetros de imobilização afetam o desempenho dos biocatalisadores magnéticos, principalmente quanto as atividades de hidrólise e esterificação, considerando a capacidade máxima de cada suporte. Pois, o entendimento da relação entre a morfologia dos suportes magnéticos com a imobilização das enzimas e o desempenho dos biocatalisadores representam importantes avanços no desenvolvimento de biocatalisadores, contribuindo para o progresso científico da biocatálise.

CONCLUSÕES

- Um novo biocatalisador magnético foi obtido a partir da imobilização de CALB em suportes de poli(estireno-*co*-divinilbenzeno) magnéticos;
- As diferentes morfologias dos suportes S1, S2 e S3 (preparados com 50, 100 e 150% de diluição em *n*-heptano, respectivamente) não promoveram variação de rendimento de imobilização (%) e concentração de proteínas retida (mg/g_{suporte}), aproximadamente 82% e 2,2 mg/g_{suporte}, respectivamente;
- As diferentes morfologias dos suportes possivelmente influenciaram no potencial de conversão de oleato de etila (%C), uma vez que o BioS1 (preparado a partir do suporte com menor diâmetro e volume de poros, aproximadamente 48 Å e 0,36 m²g⁻¹, respectivamente) apresentou o menor %C (aproximadamente 30%). Ao passo que BioS2 e BioS3 (obtidos a partir de suportes com maiores diâmetro de poros – aproximadamente 131 e 90 Å, respectivamente – e volume de poros – aproximadamente 0,71 e 0,60 m²g⁻¹, respectivamente – obtiveram maiores %C (aproximadamente 60%);
- O estudo da esterificação do ácido oleico em diferentes temperaturas (30, 40, 50 e 60 °C) mostrou que a estrutura do suporte S2 provavelmente influenciou no percentual de conversão de oleato de etila (%C), em comparação a CALB livre, em todas as temperaturas avaliadas. Sugerindo uma proteção térmica às enzimas imobilizadas, uma vez que o biocatalisador magnético obtido (BioS2) apresentou maior %C em todas as temperaturas testadas, em comparação a CALB livre (em 24 h de reação);
- Os resultados do estudo de especificidade ao tamanho de cadeia carbônica dos ácidos graxos (AG) sugeriram que a imobilização da CALB no suporte S2 favoreceu o percentual de conversão de ésteres (C%) de AG com maiores tamanhos de cadeia carbônica, em comparação a CALB livre, uma vez que o biocatalisador magnético obtido (BioS2) apresentou melhor C% para os ácidos palmítico, esteárico e oleico, em

comparação a CALB livre, que por sua vez apresentou maior C% para o ácido cáprico (AG com menor tamanho de cadeia carbônica empregado no estudo);

- O biocatalisador magnético obtido (BioS2) manteve aproximadamente 50% de seu percentual de conversão de oleato de etila (%C) por 5 ciclos de uso, sendo facilmente recuperado magneticamente a cada ciclo, sem perda de biocatalisador durante o processo de recuperação e em seguida, lavado com água destilada e etanol 70% para posterior reuso.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, J. A. A. *et al.* Sustainable nanomagnetism: investigating the influence of green synthesis and pH on iron oxide nanoparticles for enhanced biomedical applications. **Polymers**, v. 15, n. 18, p. 3850, 2023. Doi: 10.3390/polym15183850
- ABOUELKHEIR, S. S.; IBRAHIM, H. A. H; BELTAGY, E. A. Functionalized maghemite superparamagnetic iron oxide nanoparticles (γ -Fe₂O₃-SPIONs)-amylase enzyme hybrid in biofuel production. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 11117, 2023. Doi: 10.1038/s41598-023-37826-2
- ADAK, S.; BANERJEE, R. A green approach for starch modification: Esterification by lipase and novel imidazolium surfactante. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 359-368, 2016. Doi: doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.038
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013. Doi: 10.1039/C3CS35446F
- AFZAL, H. A. *et al.* Nanopartículas magnéticas enxertadas com polímero funcionalizado com epóxi por polimerização fácil iniciada na superfície para estudos de imobilização da lipase B de *Candida antarctica*. **Reactive and Functional Polymers**, v. 147, p. 104454, 2020. Doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2019.104454
- AGUIEIRAS, E. C. G. *et al.* Estudo do comportamento da lipase comercial Lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 646-650, 2013. Doi: doi.org/10.1590/S0100-40422013000500006
- AL-MADHAGI, H. *et al.* Magnetite Nanoparticle Co-Precipitation Synthesis, Characterization, and Applications: Mini Review. **Bionanoscience**, v. 13, n. 2, p. 853-859, 2023. Doi: 10.1007/s12668-023-01113-1
- AL-QODAH, Z. *et al.* Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: a review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 121, p. 94-106, 2017. Doi: 10.1016/j.bej.2017.02.003
- AL-QODAH, Z. *et al.* On the performance of immobilized cell bioreactors utilizing a magnetic field. **Reviews in Chemical Engineering**, v. 34, n. 3, p. 385-408, 2018. Doi: 10.1515/revce-2016-0059
- ARMENIA, I. *et al.* Enzyme activation by alternating magnetic field: Importance of the bioconjugation methodology. **Journal of colloid and interface science**, v. 537, p. 615-628, 2019. Doi: 10.1016/j.jcis.2018.11.058
- ARSHADY, R. Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey. **Colloid and Polymer Science**, v. 270, p. 717-732, 1992. Doi: doi.org/10.1007/BF00776142

ASMAT, S.; HUSAIN, Q. A robust nanobiocatalyst based on high performance lipase immobilized to novel synthesised poly(o-toluidine) functionalized magnetic nanocomposite: Sterling stability and application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 99, p. 25-36, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.msec.2019.01.070

AYYAPPAN, S. *et al.* Effect of surfactant monolayer on reduction of Fe₃O₄ nanoparticles under vacuum. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 112, n. 47, p. 18376-18383, 2008. Doi: doi.org/10.1021/jp8052899.

AZIZ, M. S. *et al.* Glucose oxidase-based enzyme immobilised on tapered optical fibre for reliability improvement in selective glucose sensing. **Optik**, v. 259, p. 168970, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.ijleo.2022.168970

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996. Doi: 10.1016/0141-0229(95)00125-5

BANDIKARI, R. *et al.* Bio-affinity mediated immobilization of lipase onto magnetic cellulose nanospheres for high yield biodiesel in one time addition of methanol. **Bioresour technology**, v. 249, p. 354-360, 2018. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2017.09.156

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, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2012.04.019

BASTIDA, A. *et al.* A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998. Doi: doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19980605)58:5<486::AID-BIT4>3.0.CO;2-9

BEDANTA, S.; PETRACIC, O.; KLEEMANN, W. Chapter 1 - Supermagnetism. *In: Handbook of magnetic materials*. Elsevier, v. 23, p. 1-83, 2015. Doi: doi.org/10.1016/B978-0-444-63528-0.00001

BEHZAD, S.; CHEGEL, R. Tailoring thermoelectric properties through carbon doping and magnetic field variation: A comparative study in 2D h-BN and h-SiC. **Chinese Journal of Physics**, v. 87, p. 398-414, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.cjph.2023.12.003

BENTO, H. B. S. *et al.* Magnetized poly (STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 426, p. 95-101, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.061

BESTETI, M. D. **Produção de partículas poliméricas com porosidade controlada para a preparação de biocatalisadores**. 2011. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Engenharia Química/COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

BEZBRADICA, D. *et al.* The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3-4, p. 97-101, 2007. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.12.003

BILAL, M. *et al.* Bio-catalysis and biomedical perspectives of magnetic nanoparticles as versatile carriers. **Magnetochemistry**, v. 5, n. 3, p. 42, 2019. Doi: doi.org/10.3390/magnetochemistry5030042

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, 1976. Doi: doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3.

E CUNHA, *et al.* Structural differences of commercial and recombinant lipase B from *Candida antarctica*: An important implication on enzymes thermostability. **International journal of biological macromolecules**, v. 140, p. 761-770, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.148

CAO, L. Immobilised enzymes: science or art?. **Current opinion in chemical biology**, v. 9, n. 2, p. 217-226, 2005. Doi: doi.org/10.1016/j.cbpa.2005.02.014

CAO, S.; LIU, B. The preparation and enzyme immobilization of hydrophobic polysiloxane supports. **Macromolecular bioscience**, v. 9, n. 4, p. 361-368, 2009. Doi: doi.org/10.1002/mabi.200800221

CAO, Y. *et al.* PEI-crosslinked lipase on the surface of magnetic microspheres and its characteristics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 189, p. 110874, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.110874

CASTANHARO, J. A. *et al.* Magnetic microspheres based on poly (divinylbenzene-*co*-methyl methacrylate) obtained by suspension polymerization. **Polímeros**, v. 25, p. 192-199, 2015. Doi: doi.org/10.1590/0104-1428.1666

CASTANHARO, J. A. **Preparação de microesferas poliméricas do tipo casca-núcleo à base de metacrilato de metila e metacrilato de glicidila com propriedades magnéticas**. 2015. 135 f. Tese (Doutorado em química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

CASTRO, A. M.; CARNIEL, A. A novel process for poly(ethylene terephthalate) depolymerization via enzyme-catalyzed glycolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 124, p. 64-68, 2017.

CAVALCANTE, A. L. G. *et al.* Advancements in enzyme immobilization on magnetic nanomaterials: toward sustainable industrial applications. **RSC advances**, v. 14, n. 25, p. 17946-17988, 2024. Doi: doi.org/10.1039/D4RA02939A

CAVALCANTI, M. H. S. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase via ionic adsorption on superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Facile synthesis and improved catalytic performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 431, p. 134128, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.cej.2021.134128

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Enzymes in green chemistry: the state of the art in chemical transformations. **Advances in enzyme technology**, p. 137-151, 2019. Doi: doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00005-4

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Nanomaterials for biocatalyst immobilization—state of the art and future trends. **RSC advances**, v. 6, n. 106, p. 104675-104692, 2016. Doi: doi.org/10.1039/C6RA22047A

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Pilot-scale development of core–shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 40, p. 46727, 2018. Doi: doi.org/10.1002/app.46727

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Synthesis of lipase/silica biocatalysts through the immobilization of CALB on porous SBA-15 and their application on the resolution of pharmaceutical derivatives and on nutraceutical enrichment of natural oil. **Molecular Catalysis**, v. 505, p. 111529, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.mcat.2021.111529

CHANDRA, P. *et al.* Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v. 19, n. 169, 2020. Doi: doi.org/10.1186/s12934-020-01428-8

CHEN, C. *et al.* An unique approach of applying magnetic nanoparticles attached commercial lipase acrylic resin for biodiesel production. **Catalysis Today**, v. 278, p. 330-334, 2016. Doi: doi.org/10.1016/j.cattod.2015.12.025

CHEN, X. *et al.* Lipase-catalyzed modification of milk fat: A promising way to alter flavor notes of goat milk products. **LWT**, v. 145, p. 111286, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111286

CHIARADIA, V. *et al.* Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly (urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 31-35, 2016. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.06.004

CHENG, M. Requirement of lid2 for interfacial activation of a family I.3 lipase with unique two lid structures. **The FEBS Journal**, v. 279, n. 19, p. 3727-3737, 2012. Doi: doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08734.x

CHOUDHURY, P.; BHUNIA, B. Industrial application of lipase: a review. **Biopharm Journal**, v. 1, n. 2, p. 41-47, 2015. ISSN: 2454-1397

CONTESINI, F. J. *et al.* Advances in Recombinant Lipases: Production, Engineering, Immobilization and Application in the Pharmaceutical Industry. **Catalysts**, v. 10, n. 9, 2020. Doi: doi.org/10.3390/catal10091032

COSTA, F. T. *et al.* Highly magnetizable crosslinked chloromethylated polystyrene-based nanocomposite beads for selective molecular separation of 4-aminobenzoic acid. **ACS omega**, v. 4, n. 3, p. 5640-5649, 2019. Doi: doi.org/10.1021/acsomega.9b00142

COUTINHO, F.; CUNHA, L.; GOMES, A. S. Suportes poliméricos para catalisadores sulfônicos: síntese e caracterização. **Polímeros**, v. 14, p. 31-37, 2004. Doi: doi.org/10.1590/S0104-14282004000100011

COUTINHO, F. M. B; SOUZA, R. R.; GOMES, A. S. Synthesis, characterization and evaluation of sulfonic resins as catalysts. **European Polymer Journal**, v. 40, n. 7, p. 1525-1532, 2004. Doi: doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.02.003

CULLITY, B. D. **Elements of X-ray diffraction**, Addison. Wesley Mass, p. 127-31, 1978.

CUNHA, A. G. *et al.* Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase—a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques. *In: Biotechnology for Fuels and Chemicals: Proceedings of the Twenty-Ninth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held, in Denver, Colorado.* Humana Press, 2008. p. 169-176. Doi: doi.org/10.1007/s12010-007-8073-3

CUNHA, A. G. *et al.* Preparation of core–shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: effect of the support nature on catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59-67, 2014. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.11.020

CUNHA, A. G. *et al.* Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 156, p. 133-145, 2009. Doi: doi.org/10.1007/s12010-008-8425-7

CUNHA, A. G. **Resolução Cinética de Derivados de Mio-inositol Catalisada por Lipases.** Ph.D Thesis. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

CUNHA, H. A. *et al.* Synthesis and Characterization of Poly(styrene-*co*-divinylbenzene) Microspheres with Polystyrene Brushes Containing Trimercaptotriazine Obtained from Surface Initiation with Bromoacetyl and Chloromethyl Groups. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.36, n.7, e-20250045, p. 1-11, 2015. Doi: doi.org/10.21577/0103-5053.20250045

DAL MAGRO, L. *et al.* Magnetic biocatalysts of pectinase and cellulase: Synthesis and characterization of two preparations for application in grape juice clarification. **International journal of biological macromolecules**, v. 115, p. 35-44, 2018. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.028

DARWISH, M. S. A. *et al.* Synthesis of magnetic ferrite nanoparticles with high hyperthermia performance via a controlled co-precipitation method. **Nanomaterials**, v. 9, n. 8, p. 1176, 2019. Doi: doi.org/10.3390/nano9081176

DEL ARCO, J. *et al.* Magnetic micro-macro biocatalysts applied to industrial bioprocesses. **Bioresource Technology**, v. 322, p. 124547, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124547

DING, X. *et al.* Efficient biocatalytic synthesis of chiral intermediate of Pregabalin using immobilized *Talaromyces thermophilus* lipase. **BioMed Research International**, n. 1, p. 6192059, 2018. Doi: doi.org/10.1155/2018/6192059

DIPPONG, T. Innovative Nanomaterial Properties and Applications in Chemistry, Physics, Medicine, or Environment. **Nanomaterials**, v. 14, n. 2, p. 145, 2024. Doi: doi.org/10.3390/nano14020145

DO NASCIMENTO, J. F. C. *et al.* Comparing a polynomial DOE model and an ANN model for enhanced geranyl cinnamate biosynthesis with Novozym® 435 lipase. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 58, p. 103240, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.bcab.2024.103240

DONG, Z. *et al.* Hyperactivation of lipase by oil-water interface in interfacial immobilization on hierarchical porous hollow silica microsphere: Dynamics, mechanism and application. **Food Bioscience**, v. 58, p. 103706, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.fbio.2024.103706

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, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.btre.2017.02.003

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, 2015. Doi: doi.org/10.1039/C5RA03798K

DOWDING, P. J.; VINCENT, B. Suspension polymerisation to form polymer beads. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 161, n. 2, p. 259-269, 2000. Doi: doi.org/10.1016/S0927-7757(99)00375-1

DROR, A. Protein engineering by random mutagenesis and structure-guided consensus of *Geobacillus stearothermophilus* lipase T6 for enhanced stability in methanol. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, p. 1515-1527, 2014. Doi: doi.org/10.1128/AEM.03371-13

DUMITRIU, E. *et al.* Preparation and properties of lipase immobilized on MCM-36 support. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 22, n. 3-4, p. 119-133, 2003. Doi: doi.org/10.1016/S1381-1177(03)00015-8

EGEA-BENAVENTE, D. *et al.* Cubic Mesocrystal Magnetic Iron Oxide Nanoparticle Formation by Oriented Aggregation of Cubes in Organic Media: A Rational Design to Enhance the Magnetic Hyperthermia Efficiency. **ACS applied materials & interfaces**, v. 15, n. 27, p. 32162-32176, 2023. Doi: doi.org/10.1021/acsami.3c03254

ELAMIN, N. Y. *et al.* Synthesis and structural of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and its effect on the structural optical, and magnetic properties of novel Poly (methyl methacrylate)/Polyaniline composite for electromagnetic and optical applications. **Optical Materials**, v. 135, p. 113323, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.optmat.2022.11332

ESMI, F. *et al.* Amine and aldehyde functionalized mesoporous silica on magnetic nanoparticles for enhanced lipase immobilization, biodiesel production, and facile separation. **Fuel**, v. 291, p. 120126, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.fuel.2021.120126

FALCIGLIA, P. P. *et al.* Physico-magnetic properties and dynamics of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles (MNPs) under the effect of permanent magnetic fields in contaminated water treatment applications. **Separation and Purification Technology**, v. 296, p. 121342, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.seppur.2022.121342

FARHAN, L. O. *et al.* Various type immobilizations of Isocitrate dehydrogenases enzyme on hyaluronic acid modified magnetic nanoparticles as stable biocatalysts. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 182, p. 217-227, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.04.026

FÉ, L. X. S. G. M. *et al.* Lipase from *Rhizomucor miehei* onto home-made hydrophobic polymers: Stable and efficient biocatalysts. **Process Biochemistry**, v. 142, p. 136-148, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2024.04.008

FERNANDES, K. V. *et al.* Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, v. 362, p. 122-129, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.060

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnology Advances*, v. 31, n. 8, p. 1808-1825, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.02.013

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185-197, 1998. Doi: doi.org/10.1016/S0009-3084(98)00042-5

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, 2008. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2008.05.009.

FIGUEIREDO, L. C. *Sistemas magnéticos nanoparticulados à base de maghemita*. 2009. 121f. Tese (Doutorado em Física) - Instituto de Física. Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

FORMIGA, W. J. F. *et al.* Microesferas poliméricas magnéticas à base de estireno e divinilbenzeno com morfologia casca e núcleo. **Polímeros**, v. 23, p. 262-269, 2013. Doi: doi.org/10.4322/polimeros.2013.075

GAO, A. *et al.* Hydrophilic modification of polyester fabric by synergetic effect of biological enzymolysis and non-ionic surfactant, and applications in cleaner production. **Journal of Cleaner Production**, v. 164, p. 277-287, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.06.214

GAO, F. *et al.* Enhancing the catalytic performance of chloroperoxidase by co-immobilization with glucose oxidase on magnetic graphene oxide. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 101-109, 2019. Doi: 10.1016/j.bej.2018.12.013

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 355-363, 2004. Doi: doi.org/10.1016/j.enzmictec.2004.06.002

GIRARDET, T. *et al.* Determination of the percentage of magnetite in iron oxide nanoparticles: A comparison between mössbauer spectroscopy and Raman spectroscopy. **Solid State Sciences**, v. 143, p. 107258, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.solidstatesciences.2023.107258

GKANTZOU, E.; PATILA, M.; STAMATIS, H. Magnetic microreactors with immobilized enzymes—from assemblage to contemporary applications. **Catalysts**, v. 8, n. 7, p. 282, 2018. Doi: doi.org/10.3390/catal8070282

GOKMEN, M. T.; DU PREZ, F. E. Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications. **Progress in Polymer Science**, v. 37, n. 3, p. 365-405, 2012.

GRAEBIN, N. G. *et al.* Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnology progress**, v. 28, n. 2, p. 406-412, 2012. Doi: doi.org/doi.org/10.1002/btpr.1508.

GUAJARDO, N.; AHUMADA, K.; DE MARÍA, P. D. Immobilized lipase-CLEA aggregates encapsulated in lentikats® as robust biocatalysts for continuous processes in deep eutectic solvents. **Journal of Biotechnology**, v. 310, p. 97-102, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.jbiotec.2020.02.003

GUPTA, S.; BHATTACHARYA, A.; MURTHY, C. N. Tune to immobilize lipases on polymer membranes: Techniques, factors and prospects. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, n. 3, p. 171-190, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.bcab.2013.04.006

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, n. 2, p. 453-468, 2009. Doi: doi.org/10.1039/B711564B

HUANG, J. *et al.* A novel mono-and diacylglycerol lipase highly expressed in *Pichia pastoris* and its application for food emulsifier preparation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 12, p. 1899-1904, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2013.08.021

HUANG, W. *et al.* Effective enzyme immobilization onto a magnetic chitin nanofiber composite. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 7, p. 8118-8124, 2018. Doi: doi.org/10.1021/acssuschemeng.8b01150

HUANG, X. *et al.* Facile Preparation of Dopamine-Modified Magnetic Zinc Ferrite Immobilized Lipase for Highly Efficient Synthesis of OPO Functional Lipid. **Journal of Renewable Materials**, v. 11, n. 5, 2023. Doi: doi.org/10.32604/jrm.2023.025888

HUI, B. H.; SALIMI, M. N. **Production of iron oxide nanoparticles by co-precipitation method with optimization studies of processing temperature, pH and stirring rate.** *In: IOP conference series: Materials Science and Engineering.* IOP Publishing, 2020. p. 012036. Doi: doi.org/10.1088/1757-899X/743/1/012036

IBIAPINO, A. L. *et al.* Síntese e caracterização de CaZrO₃ e BaZrO₃ nanoestruturados. **Química Nova**, v. 36, p. 762-767, 2013. Doi: doi.org/10.1590/S0100-40422013000600003

JACOB, J. J.; SUTHINDHIRAN, K. Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal. **Biotechnology Reports**, v. 25, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00422

JENAB, E. *et al.* Performance of two immobilized lipases for interesterification between canola oil and fully-hydrogenated canola oil under supercritical carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 263-271, 2014.

JING, Z.; WU, S. Synthesis, characterization and magnetic properties of γ -Fe₂O₃ nanoparticles via a non-aqueous medium. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 177, n. 4-5, p. 1213-1218, 2004. Doi: doi.org/10.1016/j.jssc.2003.10.034

JOSÉ, C. *et al.* Investigation of the causes of deactivation–degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol–aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3-4, p. 95-107, 2011. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.04.004

KALFAS, G.; YUAN, H.; RAY, W. H. Modeling and experimental studies of aqueous suspension polymerization processes. 2. Experiments in batch reactors. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 32, n. 9, p. 1831-1838, 1993.

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

KARAMI, N. *et al.* Green synthesis of sustainable magnetic nanoparticles Fe₃O₄ and Fe₃O₄-chitosan derived from *Prosopis farcta* biomass extract and their performance in the sorption of lead (II). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, p. 127663, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.127663

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. **Journal of molecular catalysis B: enzymatic**, v. 10, n. 1-3, p. 157-176, 2000. Doi: doi.org/10.1016/S1381-1177(00)00124-7

KHAN, F. I. *et al.* Structure prediction and functional analyses of a thermostable lipase obtained from *Shewanella putrefaciens*. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 35, n. 10, 2016. Doi: doi.org/10.1080/07391102.2016.1206837

KHAN, F. I. *et al.* The Lid Domain in Lipases: Structural and Functional Determinant of enzymatic Properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, n. 16, 2017. Doi: doi.org/10.3389/fbioe.2017.00016

KHAN, F. I. *et al.* Thermostable chitinase II from *Thermomyces lanuginosus* SSBP: Cloning, structure prediction and molecular dynamics simulations. **Journal of Theoretical Biology**, v. 374, n. 107-114, 2015. Doi: doi.org/10.1016/j.jtbi.2015.03.035

KIPARISSIDES, C. Polymerization reactor modeling: a review of recent developments and future directions. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n. 10, p. 1637-1659, 1996. Doi: doi.org/10.1016/0009-2509(96)00024-3

KLEKOTKA, U. *et al.* Nanoparticle morphology and magnetic properties modified by synthesis conditions. **Journal of Materials Research and Technology**, v. 30, p. 6464-6469, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.jmrt.2024.05.004

KLIBANOV, A. M. Enzyme stabilization by immobilization. **Analytical Biochemistry**, v. 93, p. 1-25, 1979. Doi: 10.1016/S0003-2697(79)80110-4

KOELLER, K. M.; WONG, C. Enzymes for chemical synthesis. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 232-240, 2001.

KRISTENSEN, J. B.; XU, X.; MU, H. Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: Screening of commercially available lipases. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, p. 329-334, 2005. Doi: 10.1007/s11746-005-1074-5

KUMAR, S. *et al.* Bioremediation of waste cooking oil using a novel lipase produced by *Penicillium chrysogenum* SNP5 grown in solid medium containing waste grease. **Bioresource Technology**, v. 120, p. 300-304, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2012.06.018

KUROIWA, T. *et al.* Substrate specificity of commercial lipases activated by a hydration-aggregation pretreatment in anhydrous esterification reactions. **Enzyme and Microbial**

Technology, v. 180, p. 110497, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.enzmictec.2024.110497

LAI, C. W. *et al.* Iron oxide nanoparticles decorated oleic acid for high colloidal stability. **Advances in Polymer Technology**, v. 37, n. 6, p. 1712-1721, 2018. Doi: doi.org/10.1002/adv.21829

LAVORATO, G. C. *et al.* Redox phase transformations in magnetite nanoparticles: impact on their composition, structure and biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 34, n. 19, p. 192001, 2023. Doi: doi.org/10.1088/1361-6528/acb943

LEE, S.; LEE, S. The spin structure of maghemite investigated by ^{57}Fe NMR. **New Journal of Physics**, v. 8, n. 6, p. 98, 2006. Doi: 10.1088/1367-2630/8/6/098

LEVY, H. M. *et al.* Biosynthesis of biolubricant catalyzed by lipase B de *Candida antarctica* immobilized on nanocomposite of cashew apple bagasse lignina. **Renewable Energy**, p. 122452, 2025. Doi: doi.org/10.1016/j.renene.2025.122452

LI, J. *et al.* Magnetic responsive *Thermomyces lanuginosus* lipase for biodiesel synthesis. **Materialstoday Communications**, v. 24, p. 101197, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.mtcomm.2020.101197

LI, Y. *et al.* Tamanho de poro de microesferas de poliestireno macroporoso afeta a imobilização de lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 182-189, 2010. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2010.05.007

LIMA, G. V. *et al.* Chemoenzymatic synthesis of (S)-Pindolol using lipases. **Applied Catalysis A: General**, v. 546, p. 7-14, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.apcata.2017.08.003

LIU, J. *et al.* Biodiesel production in a magnetically fluidized bed reactor using whole-cell biocatalysts immobilized within ferroferric oxide-polyvinyl alcohol composite beads. **Bioresource Technology**, v. 355, p. 127253, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127253

LIU, K. *et al.* Immobilization of pectinase and lipase on macroporous resin coated with chitosan for treatment of whitewater from papermaking. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 616-619, 2012b. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2012.07.074

LIU, L. *et al.* Enzymatic synthesis of an isopropyl ester by alcoholysis of camellia oil. **Jornal da American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 1277-1285, 2012a. Doi: doi.org/10.1007/s11746-012-2019-9

LOBATO, N. C. C.; MANSUR, M. B.; FERREIRA, A. M. Characterization and chemical stability of hydrophilic and hydrophobic magnetic nanoparticles. **Materials Research**, v. 20, n. 3, p. 736-746, 2017. Doi: doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2016-0707

LOURENÇO-NETO, J. B. *Síntese e modificação química de resinas magnéticas de poli(divinilbenzeno) para adsorção de herbicidas triazínico*. 2024. 114f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

LUTZ, S. Engineering lipase B from *Candida antarctica*. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 15, n. 18, p. 2743-2748, 2004. Doi: doi.org/10.1016/j.tetasy.2004.06.031

MACARIO, A. *et al.* Immobilization of Lipase on microporous and mesoporous materials: studies of the support surfaces. *In: Studies in Surface Science and Catalysis*. Elsevier, 2005. p. 381-394. Doi: doi.org/10.1016/S0167-2991(05)80166-1

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros**, v. 17, p. 166-179, 2007.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**, 1999.

MANOEL, E. A. *et al.* Design of a core-shell support to improve lipase features by immobilization. **RSC advances**, v. 6, n. 67, p. 62814-62824, 2016b. Doi: doi.org/10.1039/C6RA13350A

MANOEL, E. A. *et al.* Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media. **RSC advances**, v. 6, n. 5, p. 4043-4052, 2016a. Doi: doi.org/10.1039/C5RA22508F

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, 2015. Doi: doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001

MARINHO, V. S. *et al.* Efeito do meio contínuo na incorporação de material magnético em resinas de estirenodivinilbenzeno. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia** -ISSN: 1984-5693, v. 10, p. 110-110, 2018. Doi: doi.org/10.22407/1984-5693

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, 2007. Doi: doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018

MAURYA, R. *et al.* Immobilization of α -transglucosidase on silica-coated magnetic nanoparticles and its application for production of isomaltooligosaccharide from the potato peel. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 12708, 2023. Doi: doi.org/10.1038/s41598-023-38266-8

MELO, R. L. F. *et al.* A comprehensive review of recent applications and future prospects on magnetic biocatalysts. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 126709, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.12670

MELO, R. L. F. *et al.* Enhancing biocatalyst performance through immobilization of lipase (Eversa® Transform 2.0) on hybrid amine-epoxy core-shell magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, p. 130730, 2024. Doi: 10.1016/j.ijbiomac.2024.130730

MENDES, M. S. L. *et al.* Síntese e caracterização de material nanoparticulado a base de γ -Fe₂O₃ e Fe₃O₄. **Revista Eletrônica Perspectivas da Ciência e Tecnologia** - ISSN: 1984-5693, v. 11, p. 55-55, 2019. Doi: doi.org/10.22407/1984-5693.2019.v11.p.55-67

MENG, X. *et al.* Improvements of lipase performance in high-viscosity system by immobilization onto a novel kind of poly(methylmethacrylate-co-divinylbenzene) encapsulated porous magnetic microsphere carrier. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 89, p. 86-92, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2013.01.006

MISHRA, R.; MILITKY, J.; VENKATARAMAN, M. Electrospun nanofibers. **Nanotechnology in textiles**, p. 35-161, 2018. Doi: doi.org/10.1016/B978-0-08-102609-0.00002-X

MOHAMMADI, M. *et al.* Inulinase immobilized gold-magnetic nanoparticles as a magnetically recyclable biocatalyst for facial and efficient inulin biotransformation to high fructose syrup. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 846-855, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.11.160

MOSLEH, N. *et al.* Magnetic sporopollenin supported polyaniline developed for removal of lead ions from wastewater: Kinetic, isotherm and thermodynamic studies. **Chemosphere**, v. 300, p. 134461, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134461

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, 2016. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2016.01.002

NAKAMURA, A. M. **Estudos funcionais e estruturais de carboxilesterases de *Bacillus licheniformis***. 2020. 121 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

NAVARRO-LÓPEZ, D. E. *et al.* Nanocatalytic performance of pectinase immobilized over in situ prepared magnetic nanoparticles. **Heliyon**, v. 9, n. 8, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e19021

NDOCHINWA, O. G. *et al.* Current status and emerging frontiers in enzyme engineering: An industrial perspective. **Heliyon**, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e32673

NETA, N. A. S. *et al.* Enzymatic synthesis of sugar esters and their potential as surface-active stabilizers of coconut milk emulsions. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 324-331, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.10.009

NEUBERGER, T. *et al.* Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic materials**, v. 293, n. 1, p. 483-496, 2005. Doi: doi.org/10.1016/j.jmmm.2005.01.064

NEVES, J. S. *et al.* In situ production of polystyrene magnetic nanocomposites through a batch suspension polymerization process. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 296, n. 12, p. 1107-1118, 2011. Doi: doi.org/10.1002/mame.201100050

NGO, T. P. N. *et al.* Efficient transformation of grease to biodiesel using highly active and easily recyclable magnetic nanobiocatalyst aggregates. **Bioresource technology**, v. 145, p. 233-239, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2012.12.053

NGUYEN, L. H. *et al.* Effect of Gd substitution on structure, optical and magnetic properties, and heating efficiency of Fe₃O₄ nanoparticles for magnetic hyperthermia applications. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 968, p. 172205, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.jallcom.2023.172205

NOORI, R. *et al.* Bio-imprinted magnetic cross-linked polyphenol oxidase aggregates for enhanced synthesis of L-dopa, a neurodegenerative therapeutic drug. **International Journal of**

Biological Macromolecules, v. 227, p. 974-985, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.11.274

OKAY, O. Macroporous copolymer networks. **Progress in Polymer Science**, v. 25, n. 6, p. 711-779, 2000. Doi: doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00015-0

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, v. 36, p. 123-130, 2013. Doi: 10.1590/S0100-40422013000100022

ORTIZ, C. *et al.* Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst?. **Catalysis Science & Technology**, v. 9, n. 10, p. 2380-2420, 2019. Doi: doi.org/10.1039/C9CY00415G

PALLA, C. A. Production of structured lipids by acidolysis with immobilized *Rhizomucor miehei* lipases: Selection of suitable reaction conditions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 76, p. 106-115, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.11.022

PALOMO, J. M. *et al.* Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 19, p. 279-286, 2002. Doi: doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00178-9

PAITAI, P.; H-KITTIKUN, A. Magnetic cross-linked enzyme aggregates of *Aspergillus oryzae* ST11 lipase using polyacrylonitrile coated magnetic nanoparticles for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 4, p. 1319-1332, 2020. Doi: 10.1007/s12010-019-03196-7

PAPAEFTHYMIU, G. C. Nanoparticle magnetism. **Nano Today**, v. 4, n. 5, p. 438-447, 2009. Doi: doi.org/10.1016/j.nantod.2009.08.006

PARANDI, E. *et al.* Optimization of microreactor-intensified transesterification reaction of sesame cake oil (sesame waste) for biodiesel production using magnetically immobilized lipase nano-biocatalyst. **Energy Conversion and Management**, v. 295, p. 117616, 2023. Doi: 10.1016/j.enconman.2023.117616

PEDDIS, D. *et al.* Magnetic interactions: a tool to modify the magnetic properties of materials based on nanoparticles. *In: Frontiers of Nanoscience*. Elsevier, V. 6, p. 129-188, 2014. Doi: 10.1016/B978-0-08-098353-0.00004

PEDRO, K. C. N. R. *et al.* Adsorption of lipases on porous silica-based materials for esterification in a solvent-free system. **3 Biotech**, v. 13, n. 11, p. 380, 2023. Doi: doi.org/10.1007/s13205-023-03801-x

PENG, Q. *et al.* Isolation of a novel alkaline-stable lipase from a metagenomic library and its specific application for milkfat flavor production. **Microbial Cell Factories**, v. 13, n. 1, 2014. Doi: 10.1186/1475-2859-13-1

PETRACIC, O. Superparamagnetic nanoparticle ensembles. **Superlattices and Microstructures**, v. 47, n. 5, p. 569-578, 2010. Doi: doi.org/10.1016/j.spmi.2010.01.009

PHILIPPOVA, O. *et al.* Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. **European polymer journal**, v. 47, n. 4, p. 542-559, 2011. Doi: doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.11.00

PINTO, M. C. C. **Desenvolvimento de suportes enzimáticos por polimerização simultânea em suspensão e emulsão**. 2017. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

PINTO, M. C. C. *et al.* Effect of hydrophobicity degree of polymer particles on lipase immobilization and on biocatalyst performance. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 4, p. 304-314, 2020a. Doi: doi.org/10.1080/10242422.2020.1739026

PINTO, M. C. C. *et al.* Effects of reaction operation policies on properties of core-shell polymer supports used for preparation of highly active biocatalysts. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 13, n. 1, p. 1800055, 2018. Doi: doi.org/10.1002/mren.201800055

PINTO, M. C. C. *et al.* Production of new functionalized polymer nanoparticles and use for manufacture of novel nanobiocatalysts. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 305, n. 6, p. 2000065, 2020b. Doi: doi.org/10.1002/mame.202000065.

PINTO, M. C. C.; FREIRE, D. M. G; PINTO, J. C. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 12509-12530, 2014. Doi: doi.org/10.3390/molecules190812509

QUEIROZ, C. N. **Preparação e caracterização de microesferas poliméricas à base de metacrilato de glicidila e divinilbenzeno com propriedades magnéticas**. 2011. 126f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

RABELO, D.; COUTINHO, F. M. B. Porous structure formation and swelling properties of styrene-divinylbenzene copolymers. **European Polymer Journal**, v. 30, n. 6, p. 675-682, 1994a. Doi: doi.org/10.1016/0014-3057(94)90115-5.

RABELO, D.; COUTINHO, F. M. B. Structure and properties of styrene-divinylbenzene copolymers: I. Pure solvents as pore forming agents. **Polymer Bulletin**, v. 33, p. 479-486, 1994b.

RABELO, D. **Formação da estrutura porosa em copolímeros à base de estireno e divinilbenzeno**. 1993. 139f. Tese (Doutorado em Ciência) – Instituto de Macromoléculas. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1993.

RAHIMI, S. *et al.* Synthesis of antioxidant and antibacterial active quinazolinones by carboxymethyl cellulose@ MnFe₂O₄ biocatalyst. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 158, p. 111556, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.inoche.2023.111556.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Evaluation of medium components by Plackett-Burman statistical design for lipase production by *Candida rugosa* and kinetic modeling. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 24, n. 3, p. 436-444, 2008. Doi: doi.org/10.1016/S1872-2075(08)60024-2

REIS, M. O.; SOUSA, R. G.; BATISTA, A. S. M. Synthesis and characterization of poly(styrene-co-divinylbenzene) and nanomagnetite structures. **MethodsX**, v. 9, p. 101764, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.mex.2022.101764

RIBEIRO, T. S. *et al.* Influence of Textural Properties of Divinylbenzene Copolymers on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. **Materials Research**, v. 25, p. e20210440, 2022. Doi: doi.org/10.1590/1980-5373-MR-2021-0440

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, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003

RODRIGUES, R. C. *et al.* ModifyING enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013. Doi: doi.org/10.1039/C2CS35231A

RODRIGUEZ, A. *et al.* Structural and magnetic investigation of styrene-divinylbenzene encapsulated iron oxide nanoparticles. **Materials Letters**, v. 130, p. 135-138, 2014. Doi: doi.org/10.1016/j.matlet.2014.04.085

ROONASI, P.; HOLMGREN, A. A Fourier transform infrared (FTIR) and thermogravimetric analysis (TGA) study of oleate adsorbed on magnetite nano-particle surface. **Applied Surface Science**, v. 255, n. 11, p. 5891-5895, 2009. Doi: doi.org/10.1016/j.apsusc.2009.01.031

RYCHLICKA, M.; GLISZCZYNSKA, A. Interesterification of Egg-Yolk Phosphatidylcholine with p-Methoxycinnamic Acid Catalyzed by Immobilized Lipase B from *Candida antarctica*. **Catalysts**, v. 10, n. 10, 2020. Doi: doi.org/10.3390/catal10101181

SADEGHI, M.; MOGHIMIFAR, Z.; JAVADIAN, H. Fe₃O₄@ SiO₂ nanocomposite immobilized with cellulase enzyme: Stability determination and biological activity. **Chemical Physics Letters**, v. 811, p. 140161, 2023. Doi: 10.1016/j.cplett.2022.140161

SALIHU, A.; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 1, p. 86-96, 2015. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2014.10.019

SAMOYLOVA, Y. V. *et al.* Cloning, expression and characterization of the esterase estUT1 from *Ureibacillus thermosphaericus* which belongs to a new lipase family XVIII. **Extremophiles**, v. 22, p. 271- 285, 2018. Doi: doi.org/10.1007/s00792-018-0996-9

SAROJINI, G. *et al.* Bio-fabrication of porous magnetic Chitosan/Fe₃O₄ nanocomposite using *Azolla pinnata* for removal of chromium-Parametric effects, surface characterization and kinetics. **Environmental Research**, v. 218, p. 114822, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.envres.2022.114822

SELEZNEV, S. V. *et al.* Structure, magnetic properties and hyperthermia of Fe_{3-x}CoxO₄ nanoparticles obtained by wet high-energy ball milling. **Inorganic Chemistry Communications**, p. 112679, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.inoche.2024.112679

SHARMA, S.; KANWAR, S. S. Organic Solvent Tolerant Lipases and Applications. **The Scientific World Journal**, v. 15, 2014. Doi: doi.org/10.1155/2014/625258

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013. Doi: 10.1039/C3CS60075K

SHENG, Z. *et al.* Development of a green, concise synthesis of nicotinamide derivatives catalysed by Novozym® 435 from *Candida antarctica* in sustainable continuous-flow microreactors. **RSC advances**, v. 14, n. 1, p. 131-138, 2024. Doi: doi.org/10.1039/d3ra07201k

SHERINGTON, D. C. Preparação, estrutura e morfologia de suportes poliméricos. **Chemical Communications**, n. 21, p. 2275-2286, 1998. Doi: 10.1039/A803757D

SIKORA, A. *et al.* Enantioseparation of (R,S)-atenolol with the use of lipases immobilized onto new-synthesized magnetic nanoparticles. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 28, n. 2, p. 374-380, 2017. Doi: doi.org/10.1016/j.tetasy.2017.01.012

SILVA, A. K. *et al.* Evaluation of magnetic poly(methyl methacrylate) microspheres as catalysts in heterogeneous Fenton processes. **Polímeros**, v. 32, p. e2022018, 2022. Doi: 10.1590/0104-1428.20220029

SILVA, G. A. R. *et al.* Ethyl esters synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on NiFe₂O₄ magnetic nanoparticles. **Catalysis Today**, p. 115099, 2024. Doi:10.1016/j.cattod.2024.115099

SILVA, M. V. C. *et al.* Optimization of the parameters that affect the synthesis of magnetic copolymer styrene-divinylbenzene to be used as efficient matrix for immobilizing lipases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, p. 1-12, 2018. Doi: doi.org/10.1007/s11274-018-2553-1

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SING, K. S. W. Reporting physisorption data for gas/solid systems with special reference to the determination of surface area and porosity (Recommendations 1984). **Pure and applied chemistry**, v. 57, n. 4, p. 603-619, 1985. Doi: doi.org/10.1351/pac198557040603.

SOARES, F. A. S. M. *et al.* Batch and continuous lipase-catalyzed interesterification of blends containing olive oil for trans-free margarines. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 4, p. 413-428, 2013. Doi: doi.org/10.1002/ejlt.201200418

SOLER, M. A. G. *et al.* Study of molecular surface coating on the stability of maghemite nanoparticles. **Surface Science**, v. 601, n. 18, p. 3921-3925, 2007. Doi: doi.org/10.1016/j.susc.2007.04.029

SOLEYMANI, M. *et al.* Tuning the motion velocity of enzyme-driven dextran/polyacrylamide Janus nanomotors by incorporating the thermo-switchable PNIPAM moieties in their structure. **European Polymer Journal**, v. 194, p. 112113, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2023.112113

STAUCH, B.; FISHER, S. J.; CIANCI, M. Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: Protonation and the mechanism of interfacial activation1. **Journal of Lipid Research**, v. 56, n. 12, p. 2348-2358, 2015. Doi: doi.org/10.1194/jlr.M063388

STERGIOU, P. *et al.* Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.006

STRZELCZYK, P. *et al.* Crystal and molecular structure of hexagonal form of lipase B from *Candida antarctica*. **Acta Biochimica Polonica**, v. 63, n. 1, p. 103-109, 2016. Doi: doi.org/10.18388/abp.2015_1065

SUGAHARA, V. H.; VARÉA, G. S. Immobilization of *Beauveria bassiana* lipase on silica gel by physical adsorption. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 842-850, 2014. Doi: doi.org/10.1590/S1516-8913201401358

SULMAN, A. M. *et al.* Larger pores dramatically enhance activity of an immobilized enzyme in mesoporous magnetic silica. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 341, p. 112092, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.micromeso.2022.112092

TAMBORINI, L. *et al.* Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 1, p. 73-88, 2018. Doi: doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.005

TAN, B. *et al.* Lipase-polydopamine magnetic hydrogel microspheres for the synthesis of octenyl succinic anhydride starch. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 219, p. 482-490, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.07.083

TARHAN, T. *et al.* Newly synthesized multifunctional biopolymer coated magnetic core/shell Fe₃O₄@ Au nanoparticles for evaluation of L-asparaginase immobilization. **Topics in Catalysis**, v. 66, n. 9, p. 577-591, 2023. Doi: doi.org/10.1007/s11244-022-01742-y

TECELÃO, C. *et al.* Immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase: A feasible biocatalyst for the production of human milk fat substitutes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 104-110, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.bej.2012.06.001

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química nova**, v. 24, p. 808-818, 2001. Doi:10.1590/S0100-40422001000600019

THÉVENOT, J. *et al.* Magnetic responsive polymer composite materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 7099-7116, 2013. Doi doi.org/10.1039/C3CS60058K

TIMUCIN, E.; SEZERMAN, O. U. The conserved lid tryptophan, W211, potentiates thermostability and thermoactivity in bacterial thermoalkalophilic lipases. **PLoS ONE** **8:e85186**, 2013. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0085186

TISCHER, W.; KASCHE, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers?. **Trends in biotechnology**, v. 17, n. 8, p. 326-335, 1999. Doi: doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01322-0

TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of cinnamyl acetate via transesterification reaction in a solvent free médium. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 241-246, 2015. Doi: doi.org/10.1016/j.ultsonch.2015.04.022

TONGCO, J. V. *et al.* Enhancement of Hydrolysis and Biogas Production of Primary Sludge by Use of Mixtures of Protease and Lipase. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 25, p. 132-140, 2020. Doi: doi.org/10.1007/s12257-019-0302-4.

TOPRAK, T. e ANIS, P. The Effect of Enzymatic Modification on the Dyeability of Polyester Fabric with Reactive Dye. **AATCC Journal of Research**, v. 7, n. 6, p. 41-47, 2020. Doi:doi.org/10.14504/ajr.7.6.6

TORRES, P. *et al.* Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 145-153, 2008. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2007.11.008

TORRES, R. *et al.* Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 167-171, 2006. Doi: doi.org/10.1016/j.enzmictec.2006.03.025

TORQUATO, E. C. C. *et al.* Development of Biocatalysts Based on *Candida antarctica* B Lipase Immobilized Onto Crosslinked Porous Polymers Containing Varied Monomeric Compositions. **Journal of Applied Polymer Science**, p. e56845, 2025. Doi: doi.org/10.1002/app.56845

TORQUATO, E. C. C. *et al.* Synthesis of Porous Polymeric Supports with PolyHIPE Structures Based on Styrene-Divinylbenzene Copolymers. *In: Macromolecular Symposia*. 2020. p. 2000109. Doi: doi.org/10.1002/masy.202000109

UPPENBERG, J. *et al.* Crystallographic and molecular-modeling studies of lipase B from *Candida antarctica* reveal a stereospecificity pocket for secondary alcohols. **Biochemistry**, v. 34, n. 51, p. 16838-16851, 1995. Doi: doi.org/10.1021/bi00051a035

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, 1994. Doi: doi.org/10.1016/S0969-2126(00)00031-9

URIAN, Y. A. *et al.* Study of the surface properties and particle-particle interactions in oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 525, p. 167686, 2021. Doi: doi.org/10.1016/j.jmmm.2020.167686

VADGAMA, R. N. *et al.* Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I: Batch optimization studies. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 133-137, 2015.

VAGHARI, H. *et al.* Application of magnetic nanoparticles in smart enzyme immobilization. **Biotechnology Letters**, v. 38, p. 223-233, 2016. Doi: doi.org/10.1007/s10529-015-1977-z

VALVERDE, L. M. *et al.* Concentration of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids by enzymatic alcoholysis with different acyl-acceptors. **Biochemical Engineering Journal**, v. 91, p. 163-173, 2014.

VAN BEILEN, J. B.; LI, Zhi. Enzyme technology: an overview. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, n. 4, p. 338-344, 2002. Doi: doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00334-8

VAYSSE, L. *et al.* Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 648-655, 2002. Doi: doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00166-7

VERMA, D. *et al.* Advancements on microparticles-based drug delivery systems for cancer therapy. *In: Advanced Drug Delivery Systems in the Management of Cancer*. Academic Press, 2021. p. 351-358. Doi: doi.org/10.1016/B978-0-323-85503-7.00003-1

VIALI, W. R. **Síntese e Caracterização de nanopartículas de maghemita revestidas com ácido oleico para obtenção de fluidos magnéticos a base de óleos isolantes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. *et al.* Reuse of anion exchangers as supports for enzyme immobilization: Reinforcement of the enzyme-support multiinteraction after enzyme inactivation. **Process Biochemistry**, v. 51, n. 10, p. 1391-1396, 2016. Doi: doi.org/10.1016/j.procbio.2016.06.020

VIVALDO-LIMA, E. *et al.* An updated review on suspension polymerization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 4, p. 939-965, 1997. Doi: doi.org/10.1021/ie960361g

WANG, J. *et al.* Lipase immobilization onto the surface of PGMA-b-PDMAEMA-grafted magnetic nanoparticles prepared via atom transfer radical polymerization. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 22, n. 11-12, p. 1333-1339, 2014. Doi: doi.org/10.1016/j.cjche.2014.09.029

WANG, L. *et al.* In situ magnetization technique for synthesis of magnetic polymer microspheres. **Powder Technology**, v. 235, p. 1017-1024, 2013. Doi: doi.org/10.1016/j.powtec.2012.12.014

WANG, S. Z. *et al.* Lipase-catalyzed remote kinetic resolution of citalopram intermediate by asymmetric alcoholysis and thermodynamic analysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, p. 1043–1048, 2012. Doi: doi.org/10.1007/s00449-012-0690-8

WANG, W. *et al.* Magnetic macroporous chitin microsphere as a support for covalent enzyme immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 256, p. 128214, 2024. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128214

WANG, Z. *et al.* Direct, selective and ultrasensitive electrochemical biosensing of methyl parathion in vegetables using Burkholderia cepacia lipase@MOF nanofibers-based biosensor. **Talanta**, v. 197, p. 356-362, 2019. Doi: doi.org/10.1016/j.talanta.2019.01.052

WATANABE, Y. *et al.* Methyl esterification of waste fatty acids with immobilized *Candida antarctica* lipase. *Journal of Oleo Science*, v. 51, n. 10, p. 655-661, 2002. Doi: doi.org/10.5650/jos.51.655

XIAO, Q. *et al.* Design of an imaging magnetic microsphere based on photopolymerization for magnetic hyperthermia in tumor therapy. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 13, n. 10, p. 2664-2676, 2023. Doi: doi.org/10.1007/s13346-023-01347-2

XIE, W.; HUANG, M. Fabrication of immobilized *Candida rugosa* lipase on magnetic Fe₃O₄-poly(glycidyl methacrylate-co-methacrylic acid) composite as an efficient and recyclable biocatalyst for enzymatic production of biodiesel. **Renewable Energy**, v. 158, p. 474-486, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.renene.2020.05.172

XU, N. *et al.* Identification and characterization of novel promoters for recombinant protein production in yeast *Pichia pastoris*. **Yeast**, v. 35, n. 5, p. 379-385, 2018. Doi: doi.org/10.1002/yea.3301

XU, T. *et al.* Crystal structure of a mono- and diacylglycerol lipase from *Malassezia globosa* reveals a novel lid conformation and insights into the substrate specificity. **Journal of Structural Biology**, v. 178, n. 3, p. 363-369, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.jsb.2012.03.006

YAASHIKAA, P. R.; KUMAR, P. S. Fabrication and characterization of magnetic nanomaterials for the removal of toxic pollutants from water environment: A review. **Chemosphere**, v. 303, p. 135067, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.135067

YANG, J. *et al.* Electrochemical biosensor based on Novozym 435 enzymatic ring-opening polymerization for CEA detection. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 977, p. 118846, 2025. Doi: doi.org/10.1016/j.jelechem.2024.118846

YANG, W. *et al.* Characterizing LipR from *Pseudomonas* sp. R0-14 and applying in enrichment of polyunsaturated fatty acids from algal oil. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1880–1893, 2015. Doi: doi.org/10.4014/jmb.1506.06011

YE, R. *et al.* Solvent-Free Lipase-Catalyzed Synthesis of Technical-Grade Sugar Esters and Evaluation of Their Physicochemical and Bioactive Properties. **Catalysts**, v. 6, n. 6, 2016. Doi: doi.org/10.3390/catal6060078

YIN, X. *et al.* A novel chitosan microsphere as food processing enzyme immobilization carrier and its application in nucleotide production. **Food Chemistry: X**, v. 25, p. 102130, 2025. Doi: doi.org/10.1016/j.fochx.2024.102130

YUAN, H. G.; KALFAS, G.; RAY, W. H. Suspension polymerization. **Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews**, v. 31, n. 2-3, p. 215-299, 1991. Doi: doi.org/10.1080/15321799108021924

YU, D. *et al.* Study on the modification of magnetic graphene oxide and the effect of immobilized lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 216, p. 498-509, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.203

YU, X. W. *et al.* Engineering a Disulfide Bond in the Lid Hinge Region of *Rhizopus chinensis* Lipase: Increased Thermostability and Altered Acyl Chain Length Specificity. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1880–1893, 2012. Doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0046388

ZENG, S. *et al.* Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase. **ACS Catal.**, v. 8, n. 9, p. 8856–8865, 2018. Doi: doi.org/10.1021/acscatal.8b02713

ZHANG, C. *et al.* Construction of luffa sponge-based magnetic carbon nanocarriers for laccase immobilization and its application in the removal of bisphenol A. **Bioresource Technology**, v. 305, p. 123085, 2020b. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123085

ZHANG, D. *et al.* Improving immobilization of lipase onto magnetic microspheres with moderate hydrophobicity/hydrophilicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, p. 73-78, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.08.031

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, 2020a. Doi: doi.org/10.1016/j.renene.2019.06.031

ZHANG, L.; HE, R.; GU, H. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 253, n. 5, p. 2611-2617, 2006. Doi: doi.org/10.1016/j.apsusc.2006.05.023

ZHANG, W. *et al.* Green preparation of branched biolubricant by chemically modifying waste cooking oil with lipase and ionic liquid. **Journal of Cleaner Production**, v. 274, p. 122918, 2020c. Doi: doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122918

ZHANG, Y. *et al.* Immobilization of lipase on mesoporous silica nanocarriers for efficient preparation of phytosterol esters. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 286, p. 138310, 2025. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2024.138310

ZHANG, Z. *et al.* Enzymatic interesterification of palm olein in a continuous packed bed reactor: Effect of process parameters on the properties of fats and immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Lwt**, v. 162, p. 113459, 2022. Doi: doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113459

ZHAO, J. *et al.* Production, purification and biochemical characterisation of a novel lipase from a newly identified lipolytic bacterium *Staphylococcus caprae* NCU S6. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 249-257, 2020. Doi: doi.org/10.1080/14756366.2020.1861607

ZHAO, Q. *et al.* Condition optimization and kinetic evaluation of Novozym 435-catalyzed synthesis of aroma pyridine esters. **Molecular Catalysis**, v. 550, p. 113532, 2023. Doi: doi.org/10.1016/j.mcat.2023.113532

ZHENG, M. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on hydrophobic/strong cation-exchange functional silica particles for biocatalytic synthesis of phytosterol esters. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 141-146, 2012a. Doi: doi.org/10.1016/j.biortech.2011.11.128

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, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258

ZHOU, Z. *et al.* Improved activity and stability of lipase immobilized in cage-like large pore mesoporous organosilicas. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 154, p. 133-141, 2012. Doi: doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.01.003

ZHU, S. S. *et al.* Role of Met93 and Thr96 in the Lid Hinge Region of *Rhizopus chinensis* Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, p. 436-447, 2013. Doi: doi.org/10.1007/s12010-013-0209-z

ZISIS, T. *et al.* Interfacial activation of *Candida antarctica* lipase B: Combined evidence from experiment and simulation. **Biochemistry**, v. 54, n. 38, p. 5969-5979, 2015. Doi: doi.org/10.1021/acs.biochem.5b00586

ZOU, S. *et al.* Lipase-catalyzed esterification for efficient acylglycerols synthesis in a solvent-free system: Process optimization, mass transfer insights and kinetic modeling. **Food Chemistry**, p. 143151, 2025. Doi: doi.org/10.1016/j.foodchem.2025.143151