

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

TAYNNÁ CRISTINA DA CUNHA FERREIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDOS DO TIPO ESPINÉLIO COMO
SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

APUCARANA

2023

TAYNNÁ CRISTINA DA CUNHA FERREIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDOS DO TIPO ESPINÉLIO COMO
SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

**SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF SPINEL TYPE OXIDES AS A
SUPPORT FOR LIPASES IMMOBILIZATION**

Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^a Dr^a Milena Martins Andrade.

Coorientador: Prof^o Dr^o Rafael Block Samulewski.

APUCARANA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

TAYNNÁ CRISTINA DA CUNHA FERREIRA

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓXIDOS DO TIPO ESPINÉLIO COMO
SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 29/setembro/2023

Milena Martins Andrade
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Maria Ines Rezende
Doutorado
Universidade Estadual de Londrina

Marcio Eduardo Berezuk
Doutorado
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

APUCARANA

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Universo, por todas as oportunidades que têm me proporcionado e todas as bênçãos. Agradeço pela proteção, pela luz que nunca se apagou em meu caminho, por todas as portas que se abriram logo que outras foram fechadas.

À minha família por me apoiar em minhas escolhas, incluindo a escolha de prosseguir na carreira acadêmica, dando-me o suporte necessário para seguir adiante.

Aos meus pais, em especial, que fizeram de mim a pessoa que sou hoje, que me ensinaram valores importantes e que nunca me deixaram desistir.

Aos meus amigos, que são, também, uma família pra mim, por estarem ao meu lado nos momentos mais difíceis e me derem forças para continuar, mas principalmente pelos melhores momentos que já vivi.

Ao meu namorado por todas as primeiras vezes que vivemos juntos, por ser meu suporte e força nos dias em que quis desistir, por todo amor e carinho que compartilhamos no dia a dia.

A todos os professores que já passaram pela minha vida acadêmica. Aos meus queridos orientadores, que me dão os melhores conselhos, apoiam minhas decisões, dão o suporte e a direção necessária para que eu não me desvie dos objetivos, e, sobretudo por acreditarem tanto em mim.

À UTFPR pela bolsa concedida e por todos os recursos disponíveis.

Ao Laboratório Multiusuário da UTFPR-Campus Londrina (LABMulti-LD), pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Ao Laboratório Multiusuário da UTFPR-Campus Apucarana (LAMAP-AP), pelas análises de Fisissorção de Nitrogênio, Fluorescência de Raios X e pelo uso do espectrofotômetro.

Ao Laboratório de Química Probiótica (LQP) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela análise de espectroscopia no infravermelho.

RESUMO

As lipases têm ganhado destaque nos estudos catalíticos, por representar um biocatalisador versátil, com capacidade de atuação em diversas reações. Entretanto, sua aplicação é desfavorecida pelos altos custos de obtenção e risco de desnaturação. Algumas das alternativas para solução destes problemas está no uso de resíduos agroindustriais como substratos para sua produção, assim como a imobilização dessas em suportes de baixo custo, que ofereçam maior estabilidade à enzima, quando comparada com a sua forma livre, e permitam a fácil recuperação, permitindo que a mesma seja reutilizada por diversas vezes. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo testar a eficiência de suportes produzidos a partir de nanopartículas de cobalto, sendo estas impregnadas em aluminato de zinco e celite, em diferentes proporções estequiométricas, como novos suportes para imobilização de lipases. Estas enzimas foram produzidas pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, em meios contendo torta de soja e glicerol - subprodutos agroindústrias - por fermentação submersa, em condições previamente otimizadas. As cobaltitas (NiCo_2O_4 , ZnCo_2O_4 e $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$), produzidas pelo método sol-gel, as nanopartículas de óxido de cobalto (Co_3O_4), assim como as mesmas incorporadas em aluminato de zinco e diferentes proporções de Celite, tais como as partículas de aluminato de zinco, produzidas por calcinação, foram caracterizadas por FTIR, DRX, BET e MEV, e aplicadas para imobilização de enzimas. As lipases imobilizadas nos suportes também foram caracterizadas por FTIR. Após a seleção dos melhores suportes para imobilização, as partículas $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$ foram escolhidas com o objetivo de investigar sua resposta como suporte para imobilização em diferentes tempos e temperaturas, com o auxílio de planejamentos fatoriais (2^2) com pontos centrais e axiais, além de analiticamente avaliadas por Metodologia de Superfície de Resposta (MSR). O modelo preditivo evidenciou que baixas temperaturas e tempos de contato aumentariam a imobilização de lipases em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$, sendo alcançado atividade de $1054 \pm 320 \text{ U g}_{\text{Ni-Zn-Co}}^{-1}$, em 15°C e 15 min. de reação, enquanto para o suporte $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$, o modelo previu uma condição ótima em 38°C e 75 min. de contato enzima-suporte, tendo atingido, para essas condições $579 \text{ U g}_{\text{Zn-Al-Co}}^{-1}$, demonstrando a eficiência de imobilização. Estes suportes foram avaliados quanto a estabilidade térmica (40 a 55°C) e em solventes (água, glicerol e etanol) alcançando estabilidade por até 24 h a 55°C e boa estabilidade em etanol e água, tornando este biocatalisador promissor para aplicações, assim como a biomassa fúngica resultante do processo de fermentação.

Palavras-chave: enzimas de fungos; enzimas imobilizadas; cobalto; partículas magnéticas.

ABSTRACT

Lipases have gained prominence in catalytic studies, as they represent a versatile biocatalyst capable of acting in different reactions. However, its application needs to be improved because of the high costs of obtaining it and the risk of denaturation. Some of the alternatives for solving these problems are the use of agroindustrial residues as substrates for their production, as well as their immobilization on low-cost supports, which offer more excellent stability to the enzyme when compared to its free form and allow easy recovery, allowing it to be reused several times. This study aimed to test the efficiency of supports made from cobalt nanoparticles, impregnated with zinc aluminate and celite in different stoichiometric proportions, as new supports for immobilizing lipases. These enzymes were produced by the fungus *Botryosphaeria ribis* EC-01 in media containing soybean cake and glycerol, agroindustry byproducts, by submerged fermentation under previously optimized conditions. The cobaltites (NiCo_2O_4 , ZnCo_2O_4 and $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$), produced by the sol-gel method, the cobalt oxide nanoparticles (Co_3O_4), as well as those incorporated into zinc aluminate and different proportions of Celite, as well as the zinc aluminate particles, produced by calcination, were characterized by FTIR, XRD, BET and SEM, and applied for enzyme immobilization. The lipases immobilized on the supports were also characterized by FTIR. After selecting the best supports for immobilization, $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$ and $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$ were chosen to investigate their response as support for immobilization at different times and temperatures, with the aid of factorial designs (2^2) with central points and axial points, in addition to being analytically evaluated using Response Surface Methodology (RSM). The predictive model showed that low temperatures and contact times would increase the immobilization of lipases on $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$, achieving an activity of $1054 \pm 320 \text{ U g}_{\text{Ni-Zn-Co}}^{-1}$ at 15°C and 15 min. of reaction while for the $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$ support, the model predicted an optimum condition at 38°C and 75 min. Of enzyme-support contact, they were achieving $579 \text{ U g}_{\text{Zn-Al-Co}}^{-1}$ for these conditions, demonstrating immobilization efficiency. These supports were evaluated for thermal stability (40 to 55°C) and in solvents (water, glycerol, and ethanol), achieving stability for up to 24 h at 55°C and good stability in ethanol and water, making this biocatalyst promising for applications, as well as the fungal biomass resulting from the fermentation process.

Keywords: fungal enzymes; immobilized enzymes; cobalt; nanoparticles.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reação de hidrólise catalisada por lipase.....	14
Figura 2 - Reações catalisadas por lipases.....	15
Figura 3 - Mecanismo de reação de transesterificação realizado por lipases.....	16
Figura 4 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas magnéticas de Co_3O_4	34
Figura 5 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas de (a) Co_3O_4 :celite 1:1 (b) Co_3O_4 :celite 1:0,5 (c) Co_3O_4 :celite 1:0,25.....	35
Figura 6 - Aplicação de campo magnético nas nanopartículas de (a) ZnAl_2O_4 e (b) $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$	36
Figura 7 - Aplicação de campo magnético nas nanopartículas de (a) NiCo_2O_4 (b) ZnCo_2O_4 (c) $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$	36
Figura 8 - Análise FTIR das amostras de Co_3O_4 ; Celite; Co_3O_4 :Ce 1:1,00; Co_3O_4 :Ce 1:0,50; Co_3O_4 :Ce 1:0,25	37
Figura 9 - Análise FTIR das amostras de Co_3O_4 ; ZnAl_2O_4 ; e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$	38
Figura 10 – Análise FTIR das amostras de NiCo_2O_4 ; ZnCo_2O_4 ; $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$	39
Figura 11 - Análise DRX das amostras de Co_3O_4 :Celite 1:1, Co_3O_4 :Celite 1:0,5 e Co_3O_4 :Celite 1:0,25 sintetizadas pelo método mecanoquímico	41
Figura 12 – Análise DRX das nanopartículas de cobalto incorporadas a aluminato de zinco .	42
Figura 13 – Análise DRX das amostras de NiCo_2O_4 ; ZnCo_2O_4 ; $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ sintetizadas pelo método citrato-gel.....	43
Figura 14 - Análise da superfície de a) ZnAl_2O_4 b) $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$ c) Co_3O_4 e por MEV ...	44
Figura 15 - Análise da superfície de $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$	45
Figura 16 – Análise da superfície de $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ por MEV.....	46
Figura 17 - Superfície de resposta para a imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$	51
Figura 18 - Perfil de desejabilidade para a imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$	52
Figura 19 - Superfície de resposta para a imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$	54
Figura 20 - Perfil de desejabilidade para a imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$	55
Figura 21 - Efeito da temperatura na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$	57
Figura 22 - Efeito da temperatura na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$	58
Figura 23 – Efeito do solvente na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$.	59
Figura 24 - Efeito do solvente na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$.	60
Figura 25 - Análise FTIR das lipases e das partículas após imobilização de lipases.....	61
Quadro 1 - Aplicações de lipases imobilizadas na indústria.....	21

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento Fatorial	32
Tabela 2 - Valores da análise elementar obtidos de (FRX) e teóricos para amostras de $ZnAl_2O_4$, Co_3O_4 e $ZnAl_2O_4 - Co_3O_4$	45
Tabela 3 – Valores da análise elementar obtidos de (EDX) e teóricos para amostras de $Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co_2O_4$	46
Tabela 4 - Resultados obtidos por BET.....	47
Tabela 5 – Resultados da triagem de imobilização	48
Tabela 6 - Planejamento fatorial (2^2) composto central rotacional para a avaliação da imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co_2O_4$ e $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$	49
Tabela 7- Análise de variância (ANOVA) para a imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co_2O_4$	50
Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para a imobilização de lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 em $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA - Análise de Variância. BDA – Batata Dextrose Agar

E.C. - Enzyme Commission.

FES – Fermentação em Estado Sólido

FSub – Fermentação Submersa

NPs - nanopartículas magnéticas

rpm - Rotação por minuto.

pNPP - Palmitato de p-nitrofenila.

pNP - p-nitrofenol.

p-valor - Nível descritivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 Lipases: Fontes, ação catalítica e aplicações	14
3.1.1 Produção de Lipases Microbianas e Biomassa.....	17
3.2 Imobilização de Lipases e seu potencial de aplicação.....	20
3.2.1 Potenciais suportes para a imobilização de Lipases	22
3.2.1.1 Nanopartículas magnéticas	23
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Produção de enzimas	25
4.1.1 Manutenção do micro-organismo e preparo do inóculo.....	25
4.1.2 Fermentação submersa e obtenção do extrato bruto enzimático	25
4.2 Determinação da atividade das lipases livres e imobilizadas	26
4.3 Determinação da concentração de proteínas.....	27
4.4 Preparo dos suportes	28
4.4.1 Produção das nanopartículas magnéticas de cobalto com e sem celite pelo método mecanoquímico	28
4.4.2 Produção das nanopartículas magnéticas de cobalto + aluminato de zinco	28
4.4.3 Produção das partículas de cobalto substituídas por Ni e Zn pelo método citrato-gel	29
4.5 Caracterização dos suportes e biocatalisadores	29
4.5.1 Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho.....	29
4.5.2 Análise por difratometria de raios X	30
4.5.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura	30
4.5.4 Análise por fisissorção de N ₂	30
4.5.5 Análise por fluorescência de raios X.....	30
4.6 Imobilização das lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01.....	31
4.6.1 Seleção dos suportes com maior potencial para imobilização	31
4.6.2 Imobilização das lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 de acordo com planejamentos fatoriais	31
4.7 Parâmetros físico-químicos das lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizadas nos melhores suportes	33
4.7.1 Estabilidade térmica das lipases imobilizadas.....	33
4.7.2 Efeito de solventes orgânicos nas lipases imobilizadas.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1 Preparo do Inóculo e Produção de enzimas.....	34
5.2 Preparo dos suportes	34
5.3 Caracterização dos suportes.....	37
5.3.1 Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho	37
5.3.2 Análise por difratometria de raios X	40
5.3.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura	43
5.3.4 Análise por fisissorção de N ₂	47
5.4 Imobilização da Lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01	48
5.4.1 Seleção dos melhores suportes	48

5.4.2 Avaliação da Imobilização da Lipase de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 de Acordo com Planejamentos Fatoriais.....	49
5.5 Parâmetros físico-químicos das lipases de <i>Botryosphaeria ribis</i> EC-01 imobilizadas nos melhores suportes	56
5.5.1 Estabilidade térmica das lipases imobilizadas.....	56
5.5.2 Efeito de solventes orgânicos nas lipases imobilizadas.....	58
5.6 Caracterização dos suportes após imobilização.....	60
6 CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS	63

INTRODUÇÃO

A catálise enzimática constitui uma ferramenta promissora para a síntese de compostos de alto valor agregado. A substituição de catalisadores químicos por enzimáticos possui vantagens como biodegradabilidade, alta especificidade de substratos, condições moderadas de reação, menor geração de resíduos e de produtos indesejáveis, emissões reduzidas, ou nulas, de CO₂, e alta eficiência. Ainda que os processos biocatalíticos se assemelhem aos métodos químicos tradicionais, alguns aspectos, como a cinética enzimática, devem ser levados em consideração, uma vez em que evitam a formação de intermediários de reação, minimizam a formação de resíduos e o consumo de energia, seguindo os preceitos da química verde.

Dentre as principais enzimas aplicadas em biocatálise, as lipases, enzimas da classe das hidrolases, definidas como glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), atuam em ligações éster e são usadas como biocatalisadores em reações de hidrólise de triacilglicerídeos em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998). Suas atrativas propriedades e a ampla gama de reações que são capazes de catalisar, fazem crescer o interesse pela sua utilização em processos industriais. No entanto, a aplicação de enzimas em sua forma livre é dificultada pela frequente desnaturação e inativação durante o processo reacional, além da dificuldade de recuperação e reciclagem deste biocatalisador. Nesse sentido, a imobilização de lipases em suportes sólidos, como os óxidos do tipo espinélio, tem sido objeto de estudo devido à sua capacidade de melhorar a estabilidade e facilitar a recuperação e a reutilização desses valiosos biocatalisadores.

As nanopartículas de óxido metálico são excelentes matrizes para a imobilização de enzimas, pois, apesar da grande área superficial, seu pequeno tamanho evita a ocorrência de impedimento estérico. Ademais, podem ser recuperadas do meio de reação por ação de campo magnético - no caso de nanopartículas magnéticas -, são recicláveis e podem ser reaplicadas em mais ciclos catalíticos sem que percam sua atividade (SINGH; DHANYA; VERMA, 2020).

Das nanopartículas de óxido metálico aplicadas para imobilização de enzimas, destacam-se as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe₃O₄), ou, simplesmente, magnetitas. Não-tóxicas, biocompatíveis, de separação seletiva da mistura de reação sob campo magnético, essas nanopartículas são amplamente empregadas para este fim (ROMERO et al., 2018). Algumas propriedades específicas, tais quais alta seletividade, porosidade, tamanho, atividade, estabilidade, composição, presença de sítios ácidos e básicos modificáveis e facilidade de separação aumentam o valor de óxidos com estrutura espinélio, mesmo sem a

presença da enzima. Quanto menor a partícula, maior sua área superficial, logo, maior a quantidade de sítios catalíticos ativos (SINGH; DHANYA; VERMA, 2020).

As nano-enzimas, nome dado para as enzimas imobilizadas em nanopartículas, são altamente estáveis e exibem vantagens como baixo custo e armazenagem simples. Podem ser empregadas para diversas aplicações, mas se destacam na produção de biocombustíveis, em especial, o biodiesel.

Com estrutura semelhante à magnetita, as cobaltitas (Co_3O_4), são materiais mais resistentes à oxidação. Dentro da estrutura AB_2O_4 , em que o Cobalto em coordenação +2 e +3 ocupa os sítios A e B, há, ainda, a possibilidade de substituição do sítio A por outros metais, como Mg, Fe, Ni, Zn, entre outros, que encaminham para o aprimoramento das propriedades desses catalisadores. Embora sejam materiais promissores, até este momento não foram considerados como suportes para imobilização de enzimas, como as lipases.

Sendo assim, o presente trabalho visa produzir um biocatalisador inovador, com um potencial visionário, a partir de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01, produzidas em condições otimizadas, com substratos de baixo valor agregado, imobilizadas em óxidos de estruturas do tipo espinélio com diferentes composições.

OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um biocatalisador a partir de lipases imobilizadas em óxidos com estrutura espinélio.

1.2 Objetivos Específicos

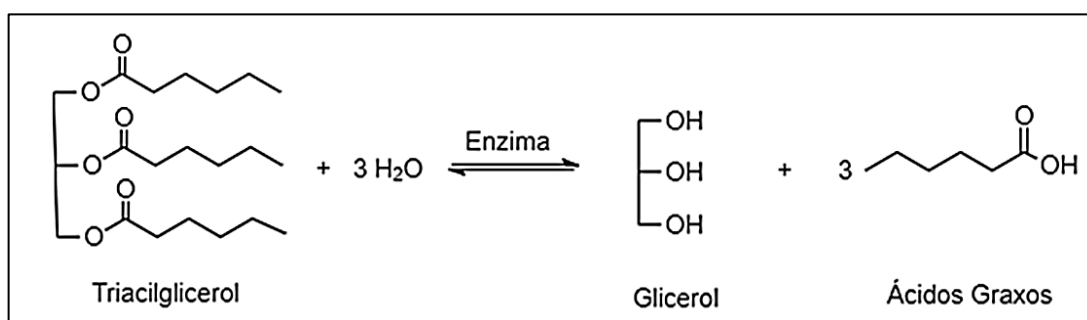
- Produzir lipases por fermentação submersa em condição previamente otimizada;
- Sintetizar cobaltitas (NiCo_2O_4 , ZnCo_2O_4 , $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$) pelo método citrato-gel;
- Sintetizar a cobaltita Co_3O_4 pelo método mecanoquímico;
- Incorporar ZnAl_2O_4 e celite, em diferentes proporções, em Co_3O_4 ;
- Imobilizar as lipases nos materiais produzidos de acordo com planejamentos fatoriais (2^2);
- Caracterizar os materiais quanto a sua composição e estrutura antes e após a imobilização (FTIR, MEV, EDX, DRX, FRX);
- Determinar as propriedades físico-químicas da lipase imobilizada nos melhores suportes.

REFERENCIAL TEÓRICO

1.3 Lipases: Fontes, ação catalítica e aplicações

Lipases são enzimas glicerol éster hidrolases (E.C.3.1.1.3), que atuam hidrolisando ligações éster de glicerídeos de cadeia longa (Figura 1), constituída por mais de 10 átomos de carbono, em diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos e glicerol (JAEGER; REETZ, 1998; ZHAO et al., 2019; ZHONG et al., 2020a).

Figura 1 – Reação de hidrólise catalisada por lipase

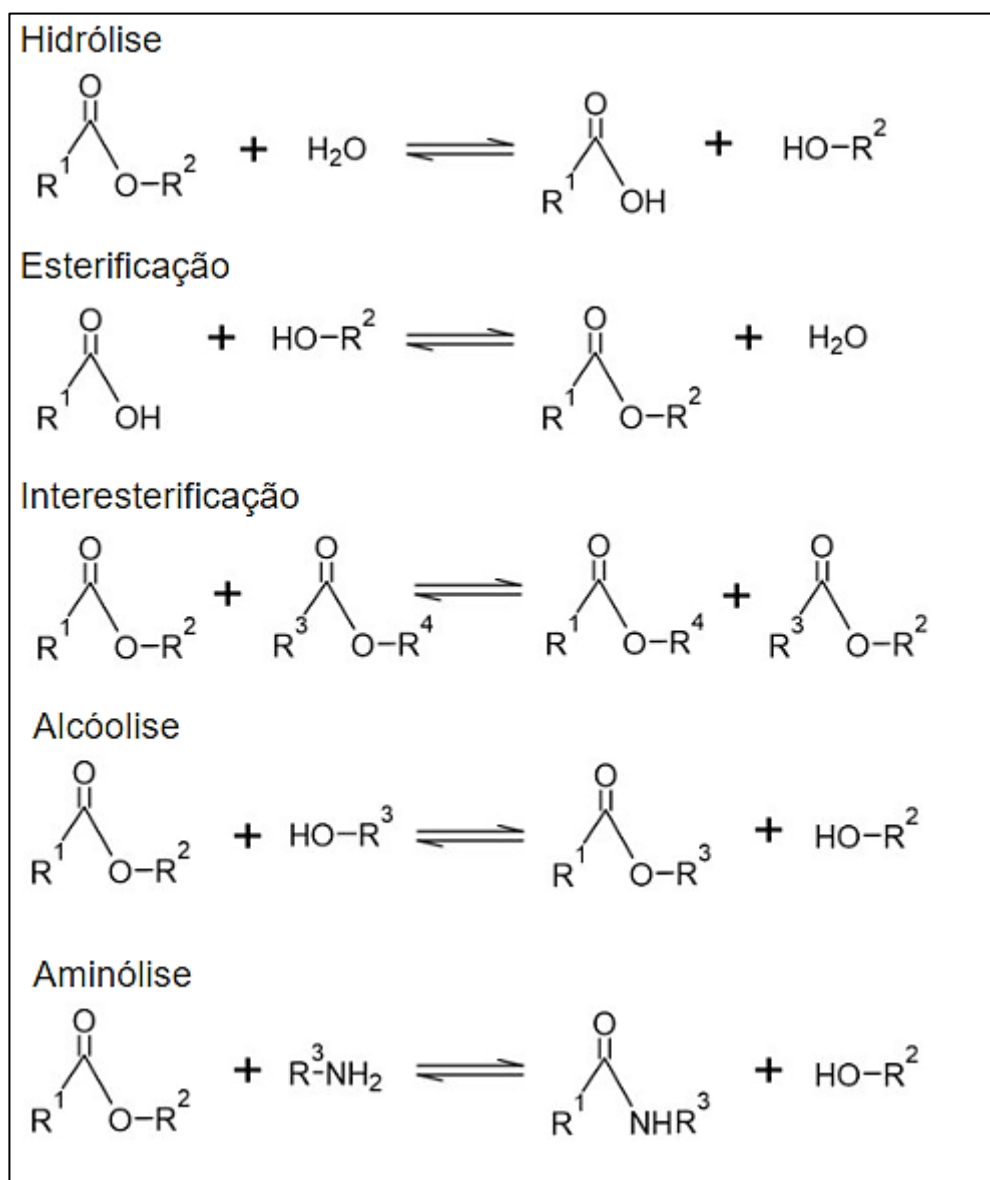


Fonte: Autoria própria (2023).

As lipases podem ser obtidas a partir de animais e plantas, entretanto, micro-organismos como fungos e bactérias, são as fontes mais eficientes, pela produção extracelular, que favorece a separação e a modificação molecular. Ademais, as lipases microbianas são mais estáveis em amplas faixas de pH e resistentes a variações de temperatura, quando comparadas àquelas que derivam de plantas e animais (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021; SAUN et al., 2014; ZHONG et al., 2020a).

O interesse pelas enzimas lipase se dá a sua aplicabilidade e adaptabilidade tecnológica e capacidade de catalisar uma ampla variedade de reações, sendo elas: hidrólise, alcoólise, aminólise, esterificação, transesterificação e interesterificação (JAEGER; REETZ, 1998; ZHONG et al., 2020a), conforme Figura 2, que estão associadas às suas propriedades de régio, químio e estereosseletividade, o que as tornam aplicáveis a diversos processos industriais (ROMERO et al., 2018).

Figura 2 - Reações catalisadas por lipases

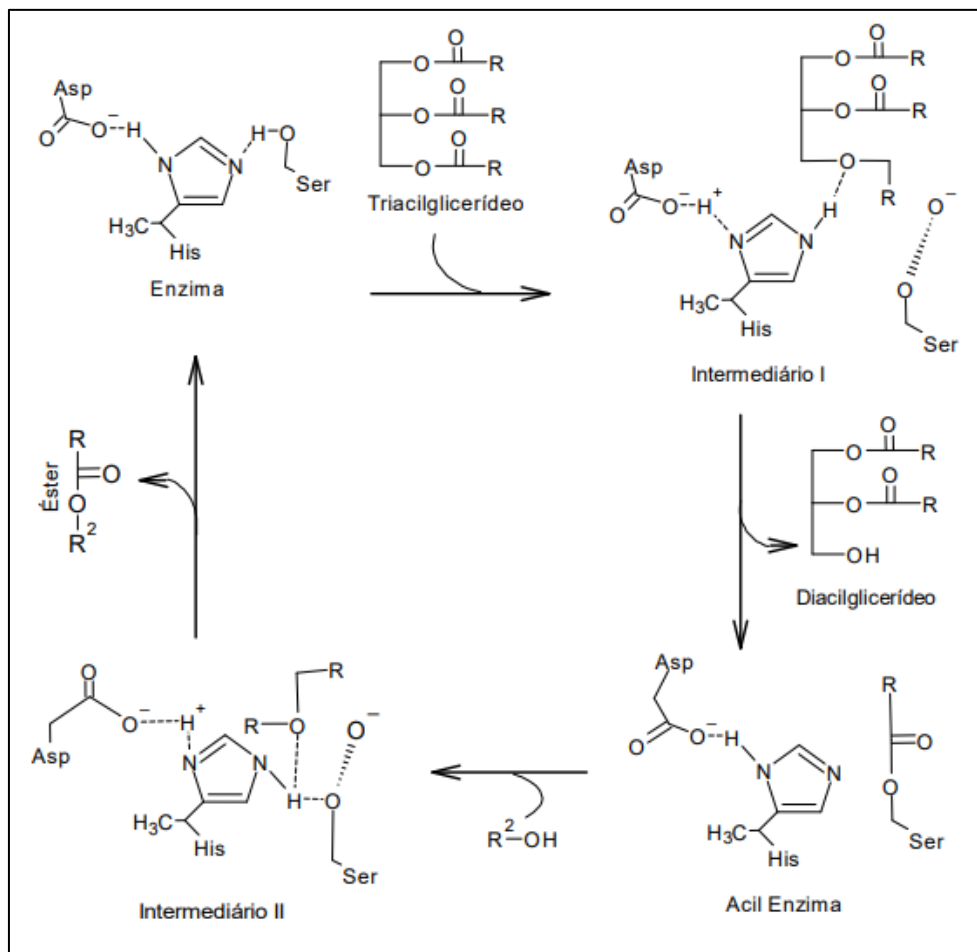


Fonte: Autoria própria (2023).

A reação de transesterificação, cujo mecanismo é apresentado na Figura 3, é uma das reações de lipases mais aplicadas industrialmente e é utilizada para diversos fins. No primeiro momento, há o ataque do átomo de oxigênio da serina do catalisador à carbonila da ligação éster, formando um intermediário tetraédrico (Intermediário I), que realiza ligações de hidrogênio com o nitrogênio do oxianion. Esse, por sua vez, é estabilizado por resíduos de aspartato e histidina no sítio ativo da enzima. O carbono da carbonila recebe, então, elétrons do oxianion, enquanto o hidrogênio da histidina é transferido para o diglicerídeo, que é liberado em seguida. O complexo serina-éster formado reage com o álcool, a fim de realizar a transesterificação. O átomo de nitrogênio da histidina libera um próton do grupo hidroxila do

álcool, formando um ânion alquila. O hidróxido ataca a carbonila do complexo serina-éster, formando o segundo intermediário tetraédrico (Intermediário II). Os elétrons são transferidos, mais uma vez, para o átomo de carbono da carbonila para formar um éster alquílico de ácido graxo. Por fim, o oxigênio da serina retorna ao hidrogênio da histidina, realizando uma rede de ligações de hidrogênio (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021).

Figura 3 - Mecanismo de reação de transesterificação realizado por lipases



Fonte: Aatoria própria (2023).

Industrialmente, as lipases são aplicadas desde a produção de biodiesel, por reações de transesterificação, uma vez que representam um meio de obtenção mais limpo, com menor geração de resíduos e redução das etapas de purificação (ISMAIL; KASHTOH; BAEK, 2021). Pode ser aplicada, também, para produção de cosméticos e tratamento de efluentes, agindo na interface água-óleo, com ampla especificidade de substratos (TANG et al., 2023)

No entanto, quando levamos em conta o elevado custo de produção, a sensibilidade a altas temperaturas e a dificuldade de recuperação do meio reacional, em conjunto com o não

reaproveitamento da enzima, sua aplicação se torna inviável. Posto isto, cresce a busca por alternativas sustentáveis e barateadas para a produção de lipases, além da imobilização, que aponta como um recurso importante, conferindo maior estabilidade física e enzimática contra eventuais formas de desnaturação proteica, aumentando a especificidade e a seletividade da enzima, diminuindo o tempo de reação, elevando a taxa de enzima para substrato, permitindo, ainda, a recuperação da enzima da mistura reacional, uma vez que a catálise passa a ser heterogênea, mantendo a enzima ativa por mais ciclos catalíticos e resultando em produtos altamente puros (BAYRAMOGLU et al., 2022; SINGH; DHANYA; VERMA, 2020; ZHAO et al., 2019).

1.3.1 Produção de Lipases Microbianas e Biomassa

O maior desafio para o emprego de enzimas em escala industrial está associado ao seu baixo rendimento e alto custo de produção e purificação. A natureza química do substrato, a escolha do micro-organismo produtor, assim como seus parâmetros fisiológicos, tanto quanto o tamanho do inóculo, as fontes de carbono e nitrogênio e a taxa de umidade do meio, constituem os fatores primordiais que afetam a síntese de enzimas. Sendo assim, a escolha dos constituintes apropriados e as condições de cultura são de suma importância para maximizar os rendimentos finais do processo de obtenção de enzimas (ARYA et al., 2022; DURÁN; TAKAHASHI; FORTES, 2019; GRECO-DUARTE et al., 2023).

O uso de resíduos orgânicos, tais como subprodutos agrícolas e animais, surgem como uma opção rentável de substratos para fermentação, com o intuito de reduzir as despesas de manufatura, que representam aproximadamente 40% do valor total da produção. Além disso, os resíduos naturais são ricos em carboidratos e proteínas e podem ser aplicados para produção de enzimas hidrolíticas em condições aeróbicas, enquanto, em condições anaeróbicas e sob ação enzimática, podem produzir biocombustíveis (ARYA *et al.*, 2022;). Subprodutos agrícolas como bagaço de cana, farelo de trigo e resíduos de soja, quando, adicionados com outros substratos ricos em carbono e nitrogênio contribuem para o crescimento dos micro-organismos e a síntese de seus respectivos metabólitos (ANDRADE et al., 2013b; ARYA et al., 2022).

Os resíduos agroindustriais constituem uma excelente fonte de nutrientes para o cultivo de micro-organismos, e como matéria-prima para a produção de lipases, sendo uma maneira de

auxiliar na reciclagem desses resíduos, promovendo, ainda, uma diminuição no custo final de produção destas enzimas (ANDRADE *et al.*, 2013).

As lipases, enzimas hidrolases, podem ser encontradas em muitas espécies de plantas, animais, insetos e micro-organismos, apresentando características físico-químicas diferentes dependendo da sua fonte de obtenção. As lipases microbianas, por exemplo, se destacam por suas características únicas: são mais estáveis em solventes orgânicos, fáceis de serem obtidas, sendo enzimas extracelulares, e, algumas, não requererem a presença de cofatores, como íons inorgânicos ou moléculas orgânicas. Dentre os micro-organismos capazes de produzir lipases, incluem-se os fungos filamentosos, as bactérias e as leveduras (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019; LIU *et al.*, 2009; MESSIAS *et al.*, 2009).

As principais bactérias produtoras de lipases são do gênero *Bacillus*, assim como outras como as *Pseudomas sp.* e *Burkholderia sp.* encontradas em diferentes habitats, como resíduos petrolíferos, fábricas de processamento de laticínios, ou solos contaminados com óleo (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

Entre as leveduras produtoras, destacam-se *Candida utilis*, *Candida rugosa*, *Rhodotorula sp.*, *Yarrowia sp.* e *Pichia sp.*, sendo a *Candida sp.* a levedura com maior potencial de produção. As propriedades bioquímicas, estruturais e catalíticas das lipases dessa classe de leveduras foram amplamente relatadas (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019).

Dentre as fontes microbianas, fungos filamentosos se sobressaem como bons produtores de lipase, com etapas de extração, purificação e processamento relativamente simples. Além disso, as lipases fúngicas exibem notáveis propriedades catalíticas únicas, sendo produzidas, principalmente, por cepas de *Rhizopus sp.*, *Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*, *Geotrichum sp.*, *Mucor sp.* O resultado da produção de lipases por fungos filamentosos depende diretamente da cepa escolhida e da composição do meio de fermentação, assim como a temperatura e as fontes de carbono e nitrogênio (BHARATHI; RAJALAKSHMI, 2019b; COLLA *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2009).

As lipases microbianas podem ser produzidas por fermentação submersa (FSub), associando o crescimento microbiano e às variações de composição e condições de cultivo, como pH, temperatura, agitação, entre outros; ou fermentação em estado sólido (FES), que utiliza substratos insolúveis, com baixas porcentagens de água em sua composição. A fermentação submersa é superior a fermentação em estado sólido devido a homogeneidade do meio de cultura e melhor controle das condições de temperatura e pH. Além da fácil separação do extrato bruto de enzimas da biomassa resultante, que pode ser realizada por filtração ou

centrifugação. Em contrapartida, a fermentação em estado sólido demanda menos água e energia. (COLLA et al., 2016; GRECO-DUARTE et al., 2023; MESSIAS et al., 2011; WOLSKI et al., 2009) .

Dentre nove cepas do gênero *Botryosphaeria*, a espécie *ribis* se destacou por produzir altos níveis de lipases em condições de fermentação submersa, utilizando farelo de soja, água destilada, óleos vegetais e glicerol como substrato, demonstrando uma alternativa sustentável para a produção dessas enzimas. (ANDRADE et al., 2013; ANDRADE et al.; 2014; MESSIAS et al., 2009).

A biomassa fúngica resultante do processo de fermentação submersa, antes tida como um resíduo da produção de lipases passou a ser vista como um coproduto, podendo, também, ser aplicada diretamente para reações de conversão em biodiesel. Isso é possível graças à possível imobilização natural da enzima ligada ao micélio fúngico (DE CASTRO et al., 2022; DURÁN; TAKAHASHI; FORTES, 2019; MAROTTI et al., 2017). A maioria das lipases utilizadas em processos catalíticos é produzida por fungos filamentosos e, em geral, são produtos extracelulares. Já as células íntegras, são compostas por todo o micro-organismo e suas enzimas, ou seja, são as lipases aderidas à superfície da biomassa fúngica resultante do processo de fermentação submersa. Essas células íntegras se provaram excelentes biocatalisadores na produção de biocombustíveis, mais especificamente do biodiesel, com vantagens no custo de produção e simplificação na operação, pois não necessitam serem submetidas às etapas de extração, isolamento e purificação, sendo uma alternativa promissora à redução de custos de aplicação da lipase como biocatalisador (DURÁN; TAKAHASHI; FORTES, 2019; MAROTTI et al., 2017).

A produção de lipase pelo fungo *Botryosphaeria ribis* EC-01, em condição de fermentação submersa, utilizando torta de soja, um resíduo agroindustrial, gera grande quantidade de biomassa, recuperada após interrupção. Essa biomassa resultante contém torta de soja não metabolizada e enzimas ligadas aos micélios fúngicos, podendo ser diretamente aplicada como catalisador (ANDRADE et al., 2013).

1.4 Imobilização de Lipases e seu potencial de aplicação

Biocatalisadores enzimáticos ganham destaque devido à ampla faixa de reações que são capazes de catalisar. No entanto, apesar das inúmeras qualidades e benefícios do uso destes biocatalisadores, sua empregabilidade nos diversos processos industriais se torna inviável devido ao risco de desnaturação da enzima em meio reacional, causada por altas temperaturas, mudanças de pH e presença de alguns solventes orgânicos, além da baixa recuperação e reutilização desses materiais.

Nesse sentido, a imobilização de enzimas se destaca como uma estratégia para reduzir as desvantagens da sua aplicação em processos industriais, sendo algumas delas, a falta de estabilidade operacional e as dificuldades de recuperação e reutilização das mesmas na sua forma livre, tendo em mãos um biocatalisador reciclável (DE ANDRADE et al., 2021). As técnicas de imobilização, assim como a escolha dos suportes a serem utilizados, podem variar de acordo com a aplicação da enzima. As interações suporte-enzima podem ocorrer por mecanismos físicos e químicos, sendo reversíveis ou irreversíveis. As técnicas aplicadas são aprisionamento, encapsulação, cross-linking, ligação covalente, ou adsorção (MEHTA; BODH; GUPTA, 2017).

A adsorção é o método de imobilização mais simplificado, dado que a interação do suporte (adsorvente) com a lipase (adsorbato) ocorre por fisissorção, ou seja, ligações de baixa energia, como interações de Van der *Waals*, ligações ácido-base e ligações de hidrogênio. Apesar dos benefícios dessa técnica, que envolvem facilidade de manuseio e redução dos reagentes, a fraca interação entre ambas as partes pode acarretar na lixiviação da lipase do suporte, causando reversibilidade do processo de imobilização, no entanto sua maior vantagem está em preservar a estrutura nativa da enzima (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; TAN et al., 2022).

A escolha do método de imobilização, assim como a seleção do suporte está diretamente interligada à aplicação do biocatalisador, ou seja, do tipo e das condições do processo catalítico. Entre os carreadores mais comuns são incluídos os polímeros naturais, como celulose e quitosana, polímeros sintéticos, resinas, celite, nanoflores, nanotubos de carbono, óxidos de grafeno, materiais híbridos e nanopartículas magnéticas (BILAL; IQBAL, 2019; SOWAN et al., 2023; ZDARTA et al., 2018), com destaque para as nanopartículas de óxido de ferro III

(Fe₃O₄), que possuem grande área de superfície, propriedades magnéticas, fácil recuperação do meio reacional, biocompatibilidade e possível reciclagem (ZHAO et al., 2019).

Quadro 1 - Aplicações de lipases imobilizadas na indústria.

Suporte de imobilização	Método	Aplicação	Referência
Ácido 2-fenoxi-2-metil-propiónico	Ligação Covalente	Herbicida	(ZHONG et al., 2020b)
Matriz de celulose suportada em óxido de grafeno via glutaraldeído	Ligação Covalente	Remoção de corante	(MAHMOUD; EL-SHARKAWY; IBRAHIM, 2022)
Polipropileno funcionalizado com amina	Ligação Covalente	Aroma de maçã verde	(BAYRAMOĞLU et al., 2011)
Nanotubos de carbono	Adsorção	Resolução cinética de ibuprofeno racêmico	(MOGUEI et al., 2022)
Nanopartículas metálicas (ZnO)	Ligação Covalente	Indústria de detergentes	(KHAN et al., 2019)
Nanopartícula magnética de quitosana	Cross-linking	Polimerização	(HOSSEINI et al., 2019)
Nanopartículas magnéticas (Fe ₃ O ₄)	Co-precipitação	Atividade antibactericida	(SEBATINI et al., 2016)
Nanopartículas magnéticas (MgFe ₂ O ₄)	Ligação Covalente	Reação de alcoólise	(ROMERO <i>et al.</i> , 2018)
Óxido de grafeno funcionalizado com óxido de titânio e de ferro	Adsorção	Produção de biodiesel	(PARANDI et al., 2023)
Carbeto de silício	Adsorção	Antioxidantes	(BERNAL et al., 2014)
Óxido de grafeno revestido com nanopartículas magnéticas (NiFe ₂ O ₄)	Adsorção	Produção de biodiesel	(AGHABEIGI et al., 2023)
Nanopartículas de poliuretano funcionalizadas com polietilenoglicol	Adsorção	Hidrólise enantiosseletiva	(CIPOLATTI et al., 2020)

Fonte: Autoria própria (2023).

As enzimas devem ser, então, utilizadas em sua forma imobilizada, ou seja, aderidas a um suporte, onde mantêm sua atividade catalítica. De forma abrangente, as aplicações industriais das lipases envolvem o processamento de gorduras na interface água-óleo, catalisando reações de hidrólise e esterificação, que abrangem a produção de biocombustíveis,

biolubrificantes, entre outros. Algumas aplicações das enzimas lipases são apresentadas no Quadro 1 (BILAL; IQBAL, 2019; SAUN et al., 2014).

1.4.1 Potenciais suportes para a imobilização de Lipases

As principais funções do suporte são: conferir proteção à estrutura da enzima contra condições adversas do meio de reação e conservar a atividade catalítica da enzima suportada. As lipases imobilizadas em diferentes tipos de suportes adquirem propriedades únicas, como por exemplo, a melhora da enantiosseletividade, da estabilidade térmica, da estabilidade em solventes e vantagem de reutilização (LIU et al., 2009).

É essencial que os suportes de imobilização sejam compatíveis com as enzimas, ou seja, que tenham alta afinidade com essas, de maneira que não haja nenhum efeito negativo em sua estrutura, de maneira que os sítios ativos estejam livres para que aconteça a ligação com o substrato. Alguns parâmetros físico-químicos devem ser levados em consideração a cerca de um suporte, como o tamanho da partícula, a área superficial, a estrutura de poros e os grupos funcionais presentes na superfície. Para tal, uma ampla variedade de materiais pode ser utilizada, sendo eles orgânicos, inorgânicos, híbridos ou compósitos (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014a; ZDARTA et al., 2018).

Os suportes inorgânicos mais comuns são as sílicas, óxidos inorgânicos, minerais (zeólitas) e materiais a base de carbono (grafeno e óxido de grafeno, nanotubos de carbono), partículas/nanopartículas magnéticas, ou não magnéticas. Já os suportes orgânicos, englobam os polímeros sintéticos, biopolímeros (alginato, quitina, quitosana), entre outros (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014b; ZDARTA et al., 2018).

Caso o material escolhido como suporte não tenha grupos funcionais capazes de interagir com os grupos funcionais da enzima em sua superfície, o material pode ser submetido à uma modificação química. O agente funcionalizante cumpre, então, o papel de se ligar ao suporte e à enzima. Os compostos mais frequentemente utilizados como agentes funcionalizantes são o glutaraldeído e a quitosana.

Celite, ou terra de diatomácea, composta principalmente de dióxido de silício (SiO_2), é um silicato quimicamente inerte com baixíssimo coeficiente de condutividade, baixa densidade e uma estrutura única de poros interconectados, sendo um material de baixo custo, o que torna

esse material uma escolha adequada como carreador para imobilização de lipases (DASH; BANERJEE, 2021).

1.4.1.1 Nanopartículas magnéticas

Os materiais em escalas nanométricas, de 1 a 100 nm, se destacam pelo amplo leque de aplicações nos setores de biologia molecular, física, química orgânica e inorgânica, medicina e ciência de materiais, devido a possibilidades de modificação em tamanho e estrutura, dependendo do seu fim. Em comparação com partículas de tamanho grande, as nanopartículas apresentam propriedades extrínsecas como distribuição de tamanho e morfologia, sem contar a razão superfície-volume de 35 a 45% maior em comparação com outras partículas ou átomos, que influenciam sua propriedade intrínseca de forte reatividade superficial (JAMKHANDE et al., 2019).

Dentre os materiais nanoparticulados conhecidos encontram-se os óxidos metálicos (por exemplo, Fe_2O_3 , ZnFe_2O_4 , NiCo_2O_4 , Co_3O_4), nanomateriais à base de carbono (por exemplo, nanotubos de carbono, óxido de grafeno), nanopartículas revestidas com polímeros e nanocompósitos (CHAIBAKHSH; MORADI-SHOEILI, 2019).

A metodologia empregada na produção de nanopartículas metálicas é de extrema importância, pois assim como a cinética de interação entre os íons metálicos com o agente redutor, ou o processo de adsorção do agente estabilizante com as nanopartículas do metal, entre outras técnicas experimentais, definirão o tamanho e a estrutura do material, as propriedades físico-químicas e suas aplicações, que vão desde cosméticos, produtos de higiene, produtos farmacêuticos e biomédicos.

As rotas de produção são resumidas em top-down e bottom-up, sendo a escolha da matéria-prima, a principal diferença entre os dois métodos (JAMKHANDE *et al.*, 2019; SINGH; DHANYA; VERMA, 2020).

No método top-down (de cima para baixo) uma força mecânica é aplicada para que as partículas a granel sejam quebradas em partículas menores. Para tal são utilizados diferentes métodos físicos, como ablação a laser, moagem, pulverização de íons, síntese mecanoquímica, entre outros. Essa metodologia é empregada principalmente para a produção de nanopartículas metálicas e cerâmicas, e, embora seja fácil e rápida, mudanças na química da superfície e

mudanças nas propriedades físico-químicas são algumas desvantagens dessa opção (JAMKHANDI *et al.*, 2019; SINGH; DHANYA; VERMA, 2020).

Na abordagem bottom-up (de baixo para cima), pequenas partículas, bem como átomos, moléculas e outros nanomateriais são reorganizados, a fim de construir complexas conformações em nanoescala, sendo empregada para a produção de nanopartículas metálicas, nanopartículas de óxidos metálicos e nanoesferas. Esse processo envolve métodos químicos e físicos, tal como método sol-gel, condensação molecular, redução química, pirólise, entre outros. Os nanomateriais são produzidos em solução coloidal, envolvendo mudança de coloração (SINGH; DHANYA; VERMA, 2020).

Os óxidos ferrimagnéticos (Fe_3O_4), também conhecidos como ferritas – nome originário do latim *ferrum*, emergem como as nanopartículas magnéticas mais empregadas como catalisadores de alta eficiência, com reação mais limpa e curta. São materiais atrativos em virtude da sua ampla faixa de aplicação em nanotecnologia, que se deve a suas propriedades elétricas e magnéticas e a estabilidade química e térmica (AMIRI; ESKANDARI; SALAVATI-NIASARI, 2019; CHAIBAKHSH; MORADI-SHOEILI, 2019; MAPOSSA *et al.*, 2020). As propriedades magnéticas desses materiais se dão em razão da estrutura em espinélio, de fórmula AB_2O_4 , onde os cátions bivalentes e trivalentes estão dispostos em sítios tetraédricos e octaédricos.

Óxidos binários do tipo espinélio constituem uma classe importante de catalisadores, pois exibem melhor atividade catalítica comparada a óxidos de um único metal. Ferritas com um dos sítios ativos substituídos por metais de transição com fórmula geral MFe_2O_4 , em que M pode ser um metal bivalente (Mg, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, etc.), trivalente (V, Cr, etc.) ou tetravalente (Ti), em proporções estequiométricas ou não, não perdem a configuração em espinélio e se cristalizam em uma estrutura cúbica de íons de oxigênio de empacotamento fechado. Nas ferritas mistas de Ni-Zn, os átomos de níquel e zinco dividem a posição A, enquanto os átomos de ferro ocupam a posição B (CHAIBAKHSH; MORADI-SHOEILI, 2019; MAPOSSA *et al.*, 2020).

No entanto, as nanopartículas de ferro são mais suscetíveis à oxidação em contato com a água e o ar atmosférico. Nesse sentido, o elemento químico cobalto, que apresenta características semelhantes às do ferro, porém é mais estável do que o mesmo, pode substituí-lo na estrutura, dando forma às Cobaltitas (MCo_2O_4).

METODOLOGIA

1.5 Preparo do Inóculo e Produção de enzimas

1.5.1 Manutenção do micro-organismo e preparo do inóculo

O micro-organismo *Botryosphaeria ribis* EC-01 (GenBank Accession Number DQ852308) foi mantido em BDA inclinado a 4 ± 2 °C e repicado trimestralmente. Para o preparo do inóculo, micro-organismo foi transferido do meio de manutenção para placas de Petri contendo meio mínimo de sais de Vogel (VOGEL, 1956), glucose 1 % (m/v) e ágar 2 % (m/v), essas foram incubadas a 28 ± 2 °C por 5 dias.

1.5.2 Fermentação submersa e obtenção do extrato bruto enzimático

Os cultivos de fermentação submersa foram desenvolvidos em Erlenmeyers de 125 mL contendo quatro esferas de 0,7 cm de diâmetro do inóculo, 25 mL de meio composto por 2,4 % de torta de soja (m/v), 4,5 % de glicerol (v/v) e água destilada, conforme produção otimizada por Andrade *et al.*, 2013. Os cultivos foram mantidos sob agitação, em shaker (180 rpm) por 5 dias a 28 ± 2 °C, e interrompidos por centrifugação (5000 rpm/15 min).

O extrato bruto foi purificado parcialmente por precipitação fracionada com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. A faixa de concentração do sal avaliada foi de 20-40% (m/v). Após esse procedimento o extrato concentrado foi dialisado contra água deionizada e armazenado até utilização a 4 °C.

A biomassa resultante do processo de fermentação foi separada, liofilizada e armazenada para posterior aplicação.

1.6 Determinação da atividade das lipases livres e imobilizadas

A atividade de lipases livres e imobilizadas foi determinada utilizando como substrato o palmitato de p-nitrofenila (pNPP) (WINKLER; STUCKMANN, 1979), sendo baseado na hidrólise do pNPP, em meio aquoso, tendo Triton X-100 como surfactante. A liberação p-nitrofenol pela ação da lipase é quantificada através da absorbância da coloração amarela no comprimento de onda de 410 nm.

A reação foi conduzida em tampão fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ (pH 8) a 55 °C por 2 min. Sendo a absorbância medida em 410 nm, o coeficiente de extinção molar para o pNP, utilizado para correlacionar a concentração do produto com a absorbância obtida na leitura é de 1,5×10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ (MESSIAS *et al.*, 2009). A unidade de atividade de lipase é definida como 1 μmol de pNP (p-nitrofenol), liberado por minuto por mL da solução da enzima.

O procedimento e o cálculo utilizado para a determinação da atividade estão descritos abaixo:

- Solução A: palmitato de p-nitrofenila (ou outros ésteres de p-nitrofenila) em álcool isopropílico, em uma concentração de 3,0 mg mL⁻¹;
- Solução B: 2 g de Triton X-100 dissolvidos em 450 mL de tampão fosfato 0,05 mol L⁻¹, pH 8,0.

A mistura reativa obtida pela adição de 1 mL da solução A em 10 mL da solução B é preparada no momento do uso, considerando que o substrato é instável.

A determinação da atividade foi desenvolvida em banho termostático a 55 °C por 2 min. O sistema de incubação continha 0,9 mL da mistura reativa e 0,1 mL do extrato enzimático - ou água destilada para o controle da reação. A leitura da atividade enzimática foi efetuada a 410 nm em espectrofotômetro.

Para a enzima imobilizada foi utilizada aproximadamente 1 mg da enzima imobilizada, em incubação com agitação, a 55 °C, durante 2 min.

O cálculo da atividade enzimática livre e imobilizada foi realizado a partir da fórmula geral (1):

$$\frac{U}{mL} \text{ ou } \frac{U}{g} = \frac{Abs}{\epsilon} \times \frac{1}{Ve \text{ ou } me/Vsol} \times \frac{1}{tr} \times DF \times 10^3 \quad (1)$$

Em que:

- $U\text{ mL}^{-1}$: unidade de atividade enzimática da solução da enzima, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;
- $U\text{ g}^{-1}$: unidade de atividade enzimática da enzima imobilizada por grama de suporte, definida de acordo com o método utilizado, nas condições padrão de ensaio;
- Abs: absorvância a λ (nm);
- ϵ : coeficiente de extinção molar ($M^{-1}\text{ cm}^{-1}$);
- V_e : volume de enzima utilizado no ensaio (mL);
- V_{sol} : volume utilizado para a reação com a enzima imobilizada (mL);
- m_e : massa da enzima utilizada no ensaio (g)
- t_r : tempo de reação (min);
- DF: fator de diluição
- 10^3 : fator de conversão de mol L^{-1} para $\mu\text{mol mL}^{-1}$.

O procedimento de quantificação da atividade de lipase descrito acima foi adotado como a condição padrão de análise de atividade enzimática.

1.7 Determinação da concentração de proteínas

A concentração de proteínas foi determinada pela metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976), que utiliza como reagente o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250. Este método é baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” e macromoléculas de proteínas que contém aminoácidos de cadeias laterais básicas ou aromáticas. No pH de reação a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante “Coomassie brilliant blue” provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica que absorve fortemente em 595 nm. A albumina de soro bovino foi utilizada como padrão para construção da curva analítica (0 – 250 mg mL^{-1}).

1.8 Preparo dos suportes

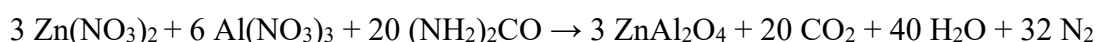
1.8.1 Produção das nanopartículas magnéticas de cobalto com e sem celite pelo método mecanoquímico

De acordo com a metodologia descrita por Medina et al. (2019), considerou-se a proporção 1:7 mol:mol de $\text{CoCl}_2:\text{NaBH}_4$ para a produção das nanopartículas de cobalto (NPs), e para a incorporação de celite considerando as razões 1:1,00 (NPs+CE_{1,00}), 1:0,50 (NPs+CE_{0,50}) e 1:0,25 (NPs+CE_{0,25}) (m/m) de celite em relação ao $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, foram pesados 0,500 g de $\text{CoCl}_2.6\text{H}_2\text{O}$, 0,556 g de NaBH_4 , 0,500, 0,250 g e 0,125g de Celite. Os compostos foram macerados por aproximadamente 5 min. em um almofariz de ágata.

Após a maceração, o produto obtido foi transferido para dois tubos de ensaio de plástico de 14 mL, aos quais foi adicionada água destilada lentamente até que parassem de efervescer. Os tubos foram, então, completados com água destilada até atingir 12 mL e levados à centrífuga (6000 rpm) durante 3 min. O sobrenadante foi retirado e esta operação foi repetida até que fosse atingido pH neutro. Terminado o processo de lavagem, o produto foi seco a vácuo.

1.8.2 Produção das nanopartículas magnéticas de cobalto + aluminato de zinco

Para a síntese do aluminato de zinco, conforme proposto por Wang *et al.* (2015), utilizou-se nitrato de zinco, nitrato de alumínio e uréia de acordo com a reação abaixo:



A mistura foi transferida para um cadinho e levada à mufla, com taxa de aquecimento de $25^\circ\text{C min}^{-1}$ até 400°C por 2 min. e, posteriormente, aquecida até 500°C , onde permaneceu durante 20 min. Após a calcinação, o material foi triturado, peneirado e pesado.

A incorporação do aluminato de zinco às nanopartículas magnéticas de cobalto se deu pelo método mecanoquímico de acordo com Medina *et al.* (2019) e foi realizada na proporção molar 1:7:1 de $\text{CoCl}_2:\text{NaBH}_4:\text{ZnAl}_2\text{O}_4$.

1.8.3 Produção das partículas de cobalto substituídas por Ni e Zn pelo método citrato-gel

As cobaltitas Ni-Zn-Co (NiCo_2O_4 , ZnCo_2O_4 , $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$) foram preparadas de acordo com metodologia proposta por Jiang *et al.* (2011), com algumas modificações. Para a síntese de $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$ os nitratos de níquel, zinco e cobalto e ácido cítrico foram usados na razão molar de Ni, Zn e Co de 1:1:4. Inicialmente, 2,90 g de $\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,97 g de $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e 11,64 g de $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foram dissolvidos em 100 mL de água destilada e, em seguida, o ácido cítrico foi adicionado à solução. A razão molar aplicada dos nitratos em relação ao ácido cítrico foi de 1:1. A solução foi agitada magneticamente por 24 h em temperatura ambiente e o excesso de água foi removido por meio de evaporador rotativo a vácuo a 60–80 °C até obtenção de um líquido viscoso.

O líquido viscoso foi seco a 80 °C por cerca de 24 h em um forno para obtenção de um gel seco que foi calcinado a 500 °C por 2 h.

1.9 Caracterização dos suportes e biocatalisadores

1.9.1 Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho

Os compostos produzidos foram analisados por espectroscopia de absorção no infravermelho em equipamento Vertex-70 da Bruker, em parceria com o Laboratório de Química Probiótica (LQP), da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O espectro de absorvância foi registrado entre 4000 e 400 cm^{-1} a partir de um filme do composto depositado entre placas de KBr.

1.9.2 Análise por difratometria de raios X

As amostras foram analisadas em um difratômetro de raio x (D2 Phaser, Bruker) com ânodo de cobre, linha de emissão característica de $1,54 \text{ \AA}$ / $8,047 \text{ keV}$ (Cu- $K\alpha_1$) e potência máxima de 300 W ($30 \text{ kV} \times 10 \text{ mA}$). A faixa angular foi de 5 a 60° em 2θ .

1.9.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos suportes, antes e após imobilização, recobertas com ouro a fim de aumentar a condutividade, foram obtidas por microscópio eletrônico TESCAN VEGA.

1.9.4 Análise por fisissorção de N_2

A área de superfície foi calculada pela equação Brunauer-Emmett-Teller (BET) aplicada às isotermas de adsorção N_2 realizadas com um aparelho Novatouch LX2, Quanta Chrome. As amostras foram secas e desgaseificadas durante 2 h a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ para remover quaisquer contaminantes orgânicos ou de humidade da superfície.

1.9.5 Análise por fluorescência de raios X

O ensaio de fluorescência de raios X (FRX) foi realizado no Laboratório Multiusuário da UTFPR-Apucarana (LAMAP), utilizando o espectrômetro de bancada Epsilon 1 (Malvern Panalytical), para verificação da composição química das amostras.

1.10 Imobilização das lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01

1.10.1 Seleção dos suportes com maior potencial para imobilização

Os suportes sintetizados: nanopartículas magnéticas de óxido de cobalto (Co_3O_4), impregnadas ou não com Celite em diferentes proporções estequiométricas (Co_3O_4 :Celite/1:1,00; Co_3O_4 :Celite/1:0,50; Co_3O_4 :Celite/1:0,25), aluminato de zinco, com e sem óxido de cobalto (ZnAl_2O_4 ; $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$), as Cobaltitas (NiCo_2O_4 ; ZnCo_2O_4 ; $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$) e o Celite - a título de comparação - foram utilizados para imobilizar lipases, a fim de se definir o suporte com melhor desempenho entre os citados.

Para tal, 3 mL de solução enzimática bruta ($\approx 25 \text{ U mL}^{-1}$) em tampão fosfato (0,05 M, pH 8) foram mantidos em contato com 60 mg de suporte em incubadora shaker, por 27 min, a 34 °C e 150 rpm, segundo Ferreira (2019).

A imobilização foi interrompida por filtração a vácuo, seguida de lavagem com tampão fosfato, pH 8, 0,02 mol L⁻¹, água destilada e hexano.

As enzimas imobilizadas foram armazenadas em frascos no freezer para posterior análise e escolha dos melhores suportes para serem aplicados em planejamentos fatoriais (2²).

1.10.2 Imobilização das lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 de acordo com planejamentos fatoriais

A imobilização de lipases de *B. ribis* EC-01 foi realizada em partículas magnéticas de cobalto impregnadas em aluminato de zinco ($\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$) e em cobaltitas substituídas por níquel e zinco ($\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$).

Uma solução enzimática com atividade enzimática próxima de 25 U mL⁻¹ foi preparada em tampão fosfato (0,05 M, pH 8) a partir das lipases previamente precipitadas e, em seguida, utilizada para imobilização nos suportes.

O suporte (100 mg) foi deixado em contato com 5 mL da solução enzimática sob agitação a 150 rpm, de acordo com planejamento fatorial 2² (11 experimentos), avaliando-se

tempo de contato (15 – 75 min) e temperatura (15 – 45°C), com os níveis inferiores (-1), centrais (0), superiores (+1) e axiais ($\pm 1,41$).

Tabela 1 – Planejamento Fatorial

Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
Variáveis codificadas					
X ₁ (tempo, min)	15	24	45	66	75
X ₂ (temperatura, °C)	15	19	30	41	45

Fonte: Próprio autor (2023).

A enzima imobilizada foi centrifugada durante 5 min. (10.000 rpm) e lavada com tampão fosfato (0,2 M, pH 8), seguida de lavagem com água destilada e seca sob vácuo.

Os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados de acordo com os planejamentos fatoriais desenvolvidos foram ajustados segundo uma equação polinomial (2), utilizando a técnica de regressão múltipla, onde Y é a resposta preditiva da atividade de lipase, tratando-se de uma variável dependente; x_i e x_j , são variáveis independentes codificadas e β_0 , β_i , β_{ii} , β_{ij} , coeficientes constantes.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=j}^k \beta_{ii} x_i x_j + \sum_{i<j} \beta_{ij} x_i x_j \quad (2)$$

As equações polinomiais quadráticas foram ajustadas com a finalidade de correlacionar as variáveis aplicadas com as respostas obtidas com os experimentos. Os coeficientes de regressão (R^2) foram utilizados com o objetivo de expressar a qualidade do ajuste dos modelos polinomiais.

A significância estatística foi determinada pelo teste-F e as análises de variância (ANOVA) e de regressão múltipla foram realizadas ao nível de 5 e 10% de significância, para Ni-Zn-Co e Zn-Al-Co, respectivamente, utilizando o programa STATISTICA Version 8.0®.

1.11 Parâmetros físico-químicos das lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizadas nos melhores suportes

1.11.1 Estabilidade térmica das lipases imobilizadas

Foram incubados 5 mg das enzimas imobilizadas nas Cobaltitas Ni-Zn-Co e nas NPs Zn-Al-Co nas seguintes temperaturas: 40, 45, 50 e 55°C, em um intervalo de 48h, em shaker, 180 rpm. Nos intervalos de tempo determinados (30', 1h, 6h, 24h e 48h), alíquotas foram removidas e ensaiadas nas condições padrão para determinação da atividade enzimática.

1.11.2 Efeito de solventes orgânicos nas lipases imobilizadas

Os solventes avaliados foram: etanol (10, 25, 50 e 99 % v/v), água destilada e glicerol (10, 20 % v/v). Para tal, as amostras contendo as lipases imobilizadas nas Cobaltitas Ni-Zn e nas NPs Zn-Al-Co (0,5 mg) e os diferentes solventes, foram incubadas em shaker em condições padrão (180 rpm, 25 °C) durante 1h. Após o tempo de reação, as amostras foram armazenadas para posterior medida da atividade das lipases nas condições padrão para determinação da atividade enzimática.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1.12 Produção de enzimas

O extrato bruto enzimático obtido na condição otimizada por Andrade *et al.* (2013), foi tratado por precipitação com sulfato de amônia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e dialisado contra água deionizada. A solução de lipases obtida foi produzida com atividade volumétrica de 25 U mL^{-1} e atividade específica de $44,5 \text{ U mg}^{-1}$.

A atividade das lipases, determinada na biomassa resultante do processo de fermentação apresentaram atividade enzimática de aproximadamente 20 U g^{-1} .

A concentração de proteínas totais medida na solução de entrada para imobilização foi de $0,562 \text{ mg mL}^{-1}$.

1.13 Preparo dos suportes

As nanopartículas de óxido de cobalto (NPs) sintetizadas pelo método mecanoquímico foram submetidas a campo magnético na presença de um ímã, conforme mostra a Figura 4 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas magnéticas de Co_3O_4 .

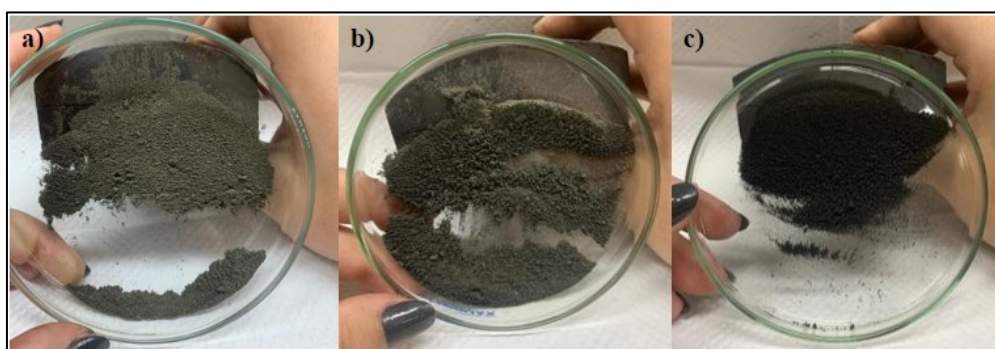
Figura 4 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas magnéticas de Co_3O_4



Fonte: Autoria própria (2023).

Foi constatada a obtenção de um pó preto, conforme relatado em Medina *et al.* (2019), com boa resposta à aplicação de campo magnético. Essas nanopartículas obtidas foram acrescentadas à diferentes proporções de Celite, com o intuito de aumentar a porosidade do material, logo sua capacidade de adsorção, no entanto sua resposta a um campo magnético externo diminui com maiores proporções de Celite. Os suportes sintetizados podem ser observados na Figura 5.

Figura 5 – Aplicação de campo magnético nas nanopartículas de (a) Co_3O_4 :celite 1:1 (b) Co_3O_4 :celite 1:0,5 (c) Co_3O_4 :celite 1:0,25



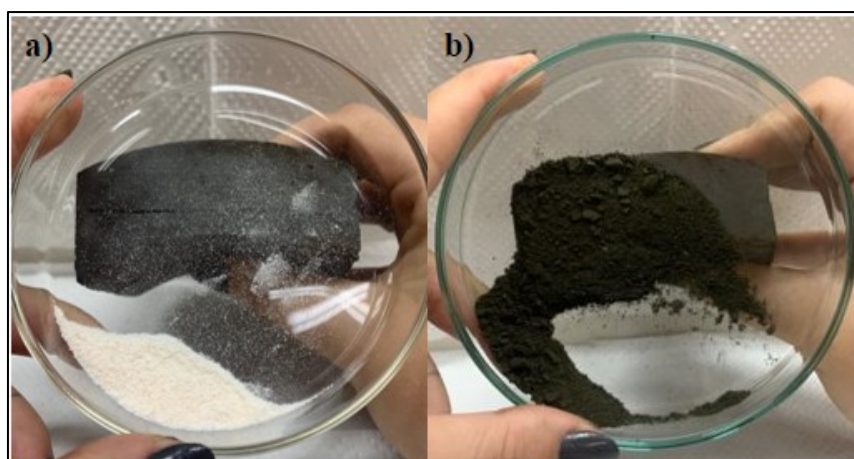
Fonte: Autoria própria (2023).

Foi possível perceber a mudança de coloração das nanopartículas, atenuando a coloração preta do óxido puro conforme aumento da proporção de Celite em relação ao óxido de cobalto. Pôde-se observar, ainda, que a maior proporção de cobalto aumenta a capacidade magnética do material, uma vez que o Celite consiste num silicato inerte. A magnetização é causada pelos átomos de cobalto metálico presentes no composto.

As nanopartículas de óxido de cobalto incorporadas ao aluminato de zinco com estrutura espinélio por maceração, formando um composto $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$, conforme mostra a Figura 6.

Foi notável a mudança na coloração da Figura 6a para a Figura 6b (de branco para verde escuro) e a resposta ao campo magnético, após a incorporação do óxido de cobalto, que era nula para o aluminato de zinco puro, demonstrando eficiência no processo de formação deste novo material.

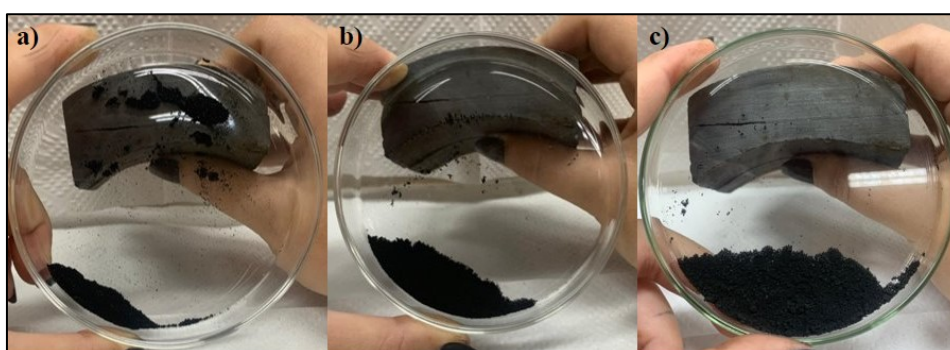
Figura 6 - Aplicação de campo magnético nas partículas de (a) ZnAl_2O_4 e (b) $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

As cobaltitas mistas produzidas pelo método citrato-gel, quando substituídas por níquel e zinco, não apresentaram boa resposta a campo magnético quando comparadas às cobaltitas com o sítio A substituídas somente por níquel, como é possível observar na Figura 7.

Figura 7 - Aplicação de campo magnético nas partículas de (a) NiCo_2O_4 (b) ZnCo_2O_4 (c) $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

A diferença aparente da capacidade magnética dos materiais pode estar associada a temperatura de calcinação dos materiais ($400\text{ }^\circ\text{C}$ para NiCo_2O_4 e ZnCo_2O_4 e $500\text{ }^\circ\text{C}$ para $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$), pois o aumento da temperatura diminui o magnetismo, tendo em vista a mudança na ordenação dos elétrons. Além disso, quanto maior a temperatura de calcinação do material, maior será o tamanho da partícula, logo, menor será sua capacidade magnética (JIANG et al., 2011).

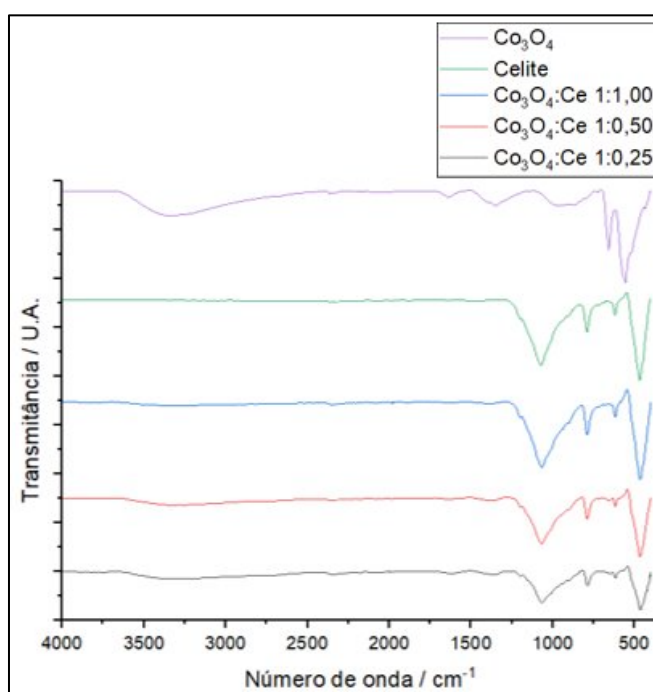
1.14 Caracterização dos suportes

1.14.1 Análise por espectroscopia de absorção no infravermelho

As nanopartículas de tetróxido de cobalto (Co_3O_4), assim como a Celite, e as nanopartículas de cobalto incorporadas a Celite nas proporções 1:1,00, 1:0,50 e 1:0,25, foram analisadas por espectroscopia de absorção no infravermelho (FTIR), conforme Figura 8.

No espectro obtido para o óxido de cobalto, podemos observar uma larga banda em $3400\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ e, ainda, em 1638 cm^{-1} outra banda menor da vibração O-H da água. Em 1347 cm^{-1} , temos o estiramento das ligações B-O de espécies do boro, causadas pela hidrólise do borohidreto de sódio, também descrito por Medina *et al.* (2019). As bandas em 660 e 560 cm^{-1} correspondem às ligações Co-O, que confirmam a obtenção do óxido de estrutura espinélio, sendo características da vibração $\text{Co}^{3+}\text{-O}$ em posição octaédrica e $\text{Co}^{2+}\text{-O}$, tetraédrica, respectivamente, relatado por Makhoulf *et al.* (2013).

Figura 8 - Análise FTIR das amostras de Co_3O_4 ; Celite; $\text{Co}_3\text{O}_4\text{:Ce}$ 1:1,00; $\text{Co}_3\text{O}_4\text{:Ce}$ 1:0,50; $\text{Co}_3\text{O}_4\text{:Ce}$ 1:0,25



Fonte: Autoria própria (2023).

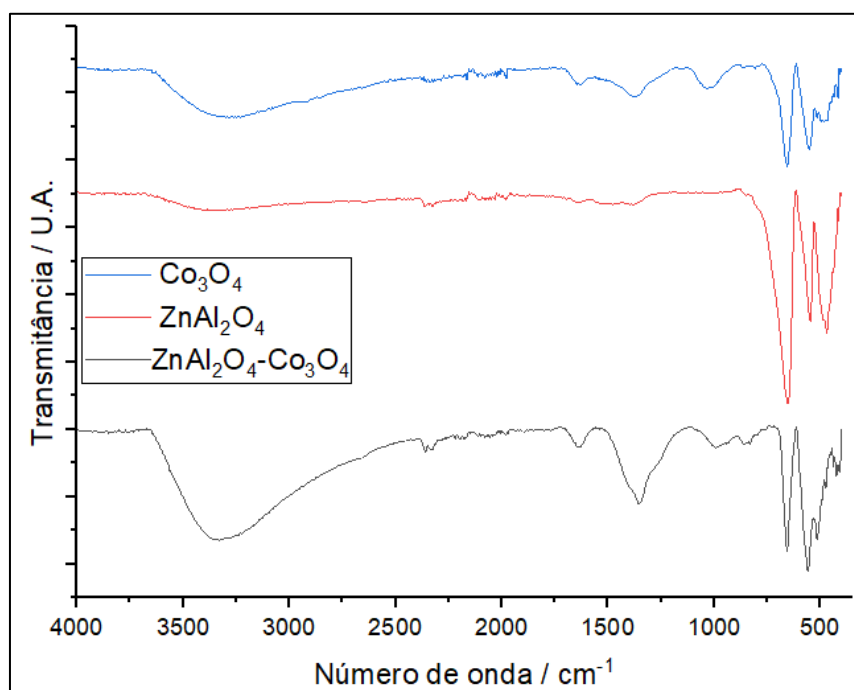
Já no espectro da Celite, as bandas mais características representam as ligações Si-O-Si, em aproximadamente 1070 e 470 cm^{-1} , além da banda em 790 cm^{-1} , que indica a ligação Si-OH.

Após a incorporação da Celite com as nanopartículas de cobalto, houve diminuição na intensidade das vibrações Co-O do óxido, assim como um decréscimo na intensidade das bandas do dióxido de silício conforme diminuição da fração de Celite em relação ao óxido de cobalto. As bandas em 1070 e 780 cm^{-1} , tem como referência os alongamentos assimétricos Si-O-Si da cristobalita, fase cristalina do óxido de silício observada também nos resultados de difratometria de raios X.

No espectro do aluminato de zinco (Figura 9) ainda existem bandas entre 1350 e 1600 cm^{-1} , resquícios dos nitratos (de 1350 a 1400 cm^{-1}) e da uréia (próximas de 1600 cm^{-1}), devido aos grupamentos C=O, C-N e N-H.

O espectro não apresenta estiramentos na região próxima a 1100 cm^{-1} , o que significa que não existem ligações tipo Al-O-Al, sendo um ponto positivo, uma vez que o material é do tipo espinélio. Os estiramentos mais característicos desse tipo de estrutura são observados em 467 cm^{-1} , 545 cm^{-1} e 645 cm^{-1} , que podem ser relacionadas as ligações Zn-O em posição tetraédrica e a vibração Al-O em sítios octaédricos, respectivamente (ZHONG et al., 2019a).

Figura 9 - Análise FTIR das amostras de Co_3O_4 ; ZnAl_2O_4 ; e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$



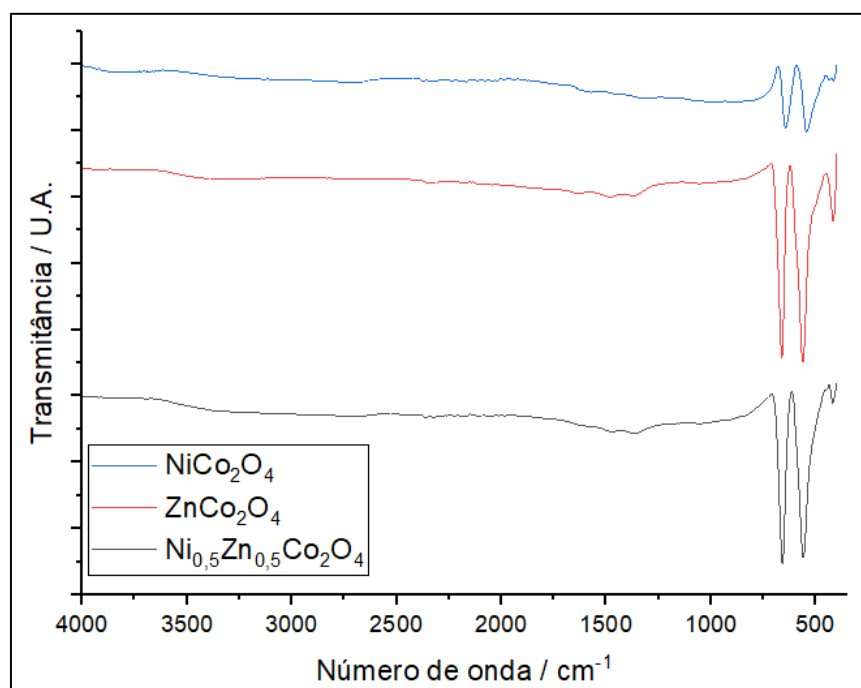
Fonte: Autoria própria (2023).

Após a incorporação do aluminato de zinco nas nanopartículas magnéticas de cobalto as principais bandas de ambos espectros se mantêm e se mesclam, apresentando apenas um leve deslocamento, o que comprova que não houve interação entre os materiais na síntese do composto $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$, uma vez que não há o surgimento de outras bandas que indiquem a formação de novas ligações, que conforme relatado por Zhong et al. (2019), apresentariam vibrações entre 1930 e 2070 cm^{-1} , referentes a interações entre cobalto e zinco em situação de adsorção do cobalto no suporte de ZnAl_2O_4 , como uma banda de absorção em 2000 cm^{-1} análoga a espécies $\text{ZnO}_x\text{-Co}^0$.

Os espectrogramas das partículas (NiCo_2O_4 ; ZnCo_2O_4 ; $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$) produzidas pelo método citrato-gel são apresentados na Figura 10.

Algumas bandas largas de baixa intensidade entre 3000 e 2000 cm^{-1} presentes em todos os espectros são referentes à ligação O-H da água, mesmo após calcinação a 500 °C . Além disso, as leves bandas observadas próximas a $1500\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$ correspondem ao ânion nitrato (NO_3^-), que se trata de um resíduo dos precursores, relatados em muitas literaturas.

Figura 10 – Análise FTIR das amostras de NiCo_2O_4 ; ZnCo_2O_4 ; $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

As bandas próximas de 545 cm^{-1} e 645 cm^{-1} para o espectro da cobaltita substituída com níquel, são referentes às ligações Ni-O, e Co-O respectivamente, também observados por Yulizar et al. (2022).

Para o espectro que contém apenas a cobaltita substituída por zinco, observa-se uma banda em 416 cm^{-1} que confirma as vibrações intrínsecas do zinco na posição tetraédrica ($\text{Zn}^{2+} - \text{O}^{2-}$) da estrutura espinélio, que está de acordo com o que foi relatado por Ashok e Kennedy (2019), também observada para a cobaltita Ni-Zn-Co, levemente deslocada e com menor intensidade. Os estiramentos em 560 cm^{-1} e 660 cm^{-1} característicos das ligações Metal-O, para Co-O e Zn-O, respectivamente, foram relatadas por Priya et al. (2019).

Os valores inversos de comprimento de onda para a ligação cobalto-oxigênio são observados para as cobaltitas de níquel e zinco em consequência da estrutura de espinélio invertido da cobaltita de níquel, que tem preferência em ocupar os sítios octaédricos da estrutura (KNYAZEV et al., 2017).

Já o espectro de $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$, é uma junção de todas as características dos dois primeiros (NiCo_2O_4 e ZnCo_2O_4), podendo ser observada a diminuição da intensidade das bandas e o deslocamento quase imperceptível da banda em 416 cm^{-1} do zinco tetraédrico, além do deslocamento da banda de maior intensidade da ligação entre o níquel e o oxigênio, devido à mistura de óxidos (KNYAZEV et al., 2017).

1.14.2 Análise por difratometria de raios X

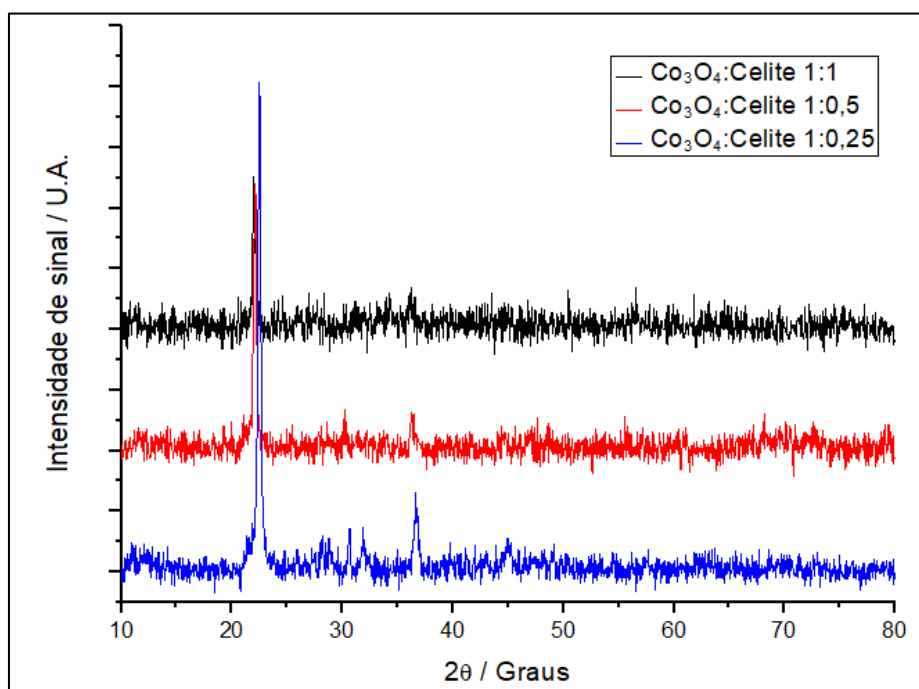
A técnica de difratometria de raios X (DRX), que consiste em determinar a cristalinidade e a pureza de um material, foi aplicada para determinar a morfologia dos suportes sintetizados.

A Figura 11 mostra os difratogramas das partículas de cobalto incorporadas com Celite em proporções de 1, 0,5 e 0,25 para 1 de tetróxido de cobalto (m/m).

O pico dominante em cada um dos difratogramas está localizado em $2\theta = 21,7-22,5^\circ$ e corresponde à cristobalita. Esse pico se desloca conforme diminuimos a razão de Celite para Cobalto, sendo ainda mais pronunciado na razão 1,00:0,25. Além disso, observamos a presença de picos menores em $2\theta = 30,0^\circ$, que diz respeito a calcita, e $36,0^\circ$, ao óxido de cobalto, ainda com destaque para as NPs+Ce_{0,25}, com picos mais sobressalentes. Ao compararmos os difratogramas das NPs de Co_3O_4 contendo Celite (Figura 11) e do difratograma das mesmas sem Celite (Figura 12) notamos a ausência desses picos, uma vez que esses podem ter sido causados pela redução do SiO_2 em reação com o borohidreto de sódio utilizado na síntese das

nanopartículas, resultando em dois materiais cristalinos derivados do celite, a cristobalita ($2\theta = 20,0^\circ$) e a calcita ($2\theta = 30,0^\circ$) (BALBAY; SELVÍTEPE; SAKA, 2021; CHEN et al., 2021).

Figura 11 - Análise DRX das amostras de Co_3O_4 :Celite 1:1, Co_3O_4 :Celite 1:0,5 e Co_3O_4 :Celite 1:0,25 sintetizadas pelo método mecanoquímico



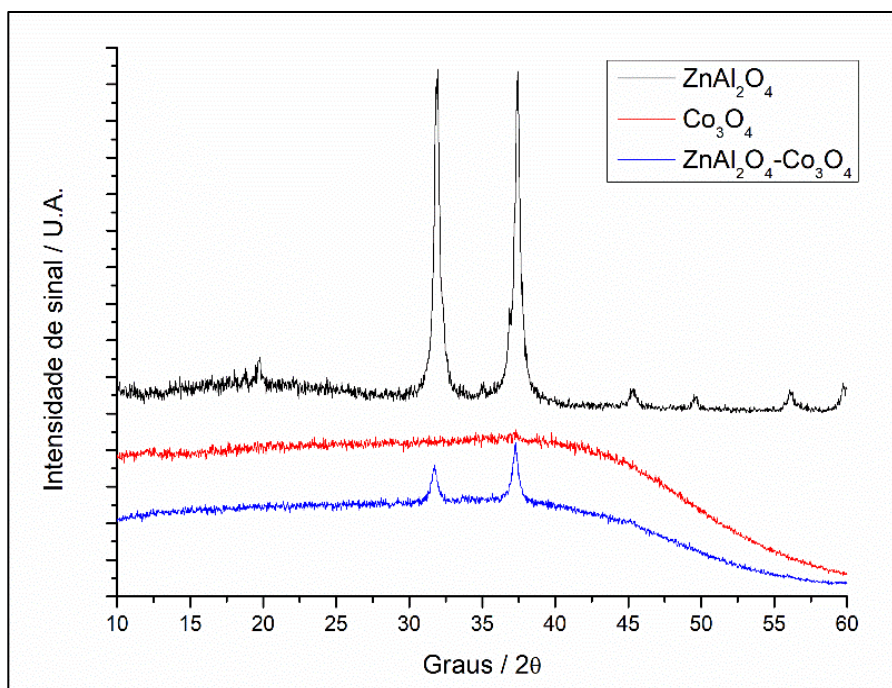
Fonte: Autoria própria (2023).

A caracterização morfológica dos materiais contendo aluminato de zinco realizada por DRX é mostrada na Figura 12.

Quando analisado individualmente, o difratograma do Co_3O_4 apresenta sinal bem alargado, típico de material amorfo, resultado já era esperado, uma vez que o método mecanoquímico tende a diminuir a cristalinidade das partículas. Além disso, em virtude do tamanho das partículas, a radiação $\text{CuK}\alpha$ ($1,5406 \text{ \AA}$) não apresenta inserção suficiente na amostra para que seja possível a caracterização de planos de reflexão em regiões mais internas da amostra e, provavelmente mais cristalinas, havendo necessidade de uso de menor comprimento de onda como fonte de radiação, por exemplo $\text{MoK}\alpha$ ($0,71073 \text{ \AA}$), para que haja maior inserção da radiação na amostra (MEDINA et al., 2019).

O difratograma do ZnAl_2O_4 , demonstra concordância com os dados obtidos por Wang et al. (2015). Os valores de $2\theta = 31,2^\circ, 36,7^\circ, 44,7^\circ, 48,9^\circ, 55,5^\circ$ e $59,2^\circ$ são correspondentes respectivamente aos planos de difração (220), (311), (400), (331), (442) e (511). (ZHONG et al., 2019b)

Figura 12 – Análise DRX das nanopartículas de cobalto incorporadas a aluminato de zinco

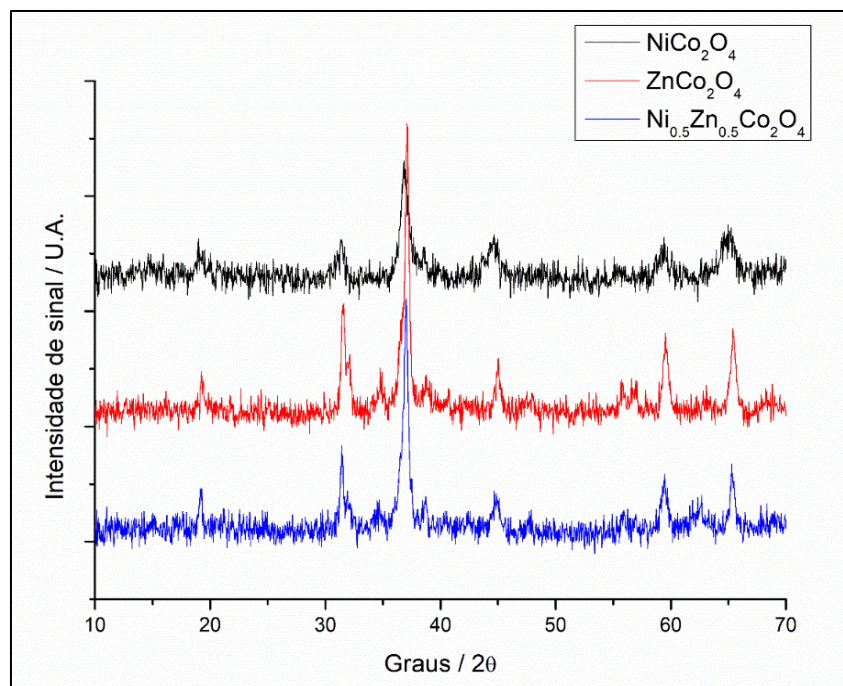


Fonte: Autoria própria (2023).

Com relação ao difratograma do compósito ZnAl₂O₄-Co₃O₄ é possível observar as duas fases coexistentes. O alargamento de sinal, exatamente como observado no difratograma do Co₃O₄, mostra que há presença de fase amorfa do óxido de cobalto. Contudo, ainda é possível notar a presença de dois picos de difração típicos do aluminato de zinco de maior intensidade em 31,22° e 36,77° e um pequeno pico com menor intensidade em 44,69°. Não há deslocamentos nos valores de 2θ quando há incorporação do óxido de cobalto na estrutura do espinélio, mostrando que não há nenhuma alteração estrutural no aluminato de zinco, apenas incorporação do óxido de cobalto na superfície.

A Figura 13, apresenta os difratogramas obtidos para as Cobaltitas substituídas por níquel, zinco e sua mistura, produzidas pelo método sol-gel.

Figura 13 – Análise DRX das amostras de NiCo_2O_4 ; ZnCo_2O_4 ; $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$ sintetizadas pelo método citrato-gel



Fonte: Autoria própria (2023).

Os difratogramas exibem picos com boas resoluções, que são características de materiais cristalinos, exibindo, ainda, um padrão para todas as cobaltitas MCo_2O_4 com picos de, em média, $19,0^\circ$, $31,4^\circ$, $37,0^\circ$, $44,6^\circ$, $55,5^\circ$, $59,4^\circ$ e $65,2^\circ$, que são indexados aos planos cristalográficos (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511) e (440), sendo que o principal pico de difração está localizado em 37° , referente ao óxido de cobalto, e está presente em todos os difratogramas. É possível observar um leve deslocamento do pico central no difratograma de NiCo_2O_4 em relação aos outros, devido ao raio maior do zinco quando comparado ao níquel.

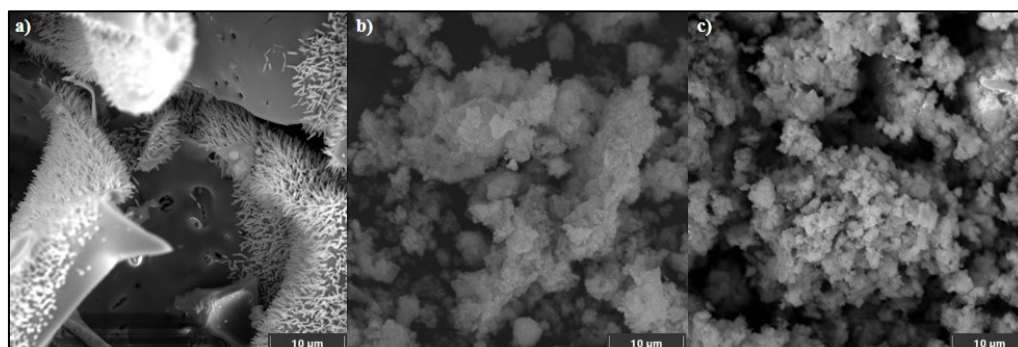
1.14.3 Análise por microscopia eletrônica de varredura

A Figura 14 mostra as imagens de micrografia eletrônica de varredura (MEV) das partículas de aluminato de zinco (ZnAl_2O_4), das nanopartículas de cobalto (Co_3O_4) e das partículas do compósito obtido a partir da maceração dos dois primeiros ($\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$).

A micrografia das amostras de aluminato de zinco mostra partículas densas, poros e alguns buracos, além de aglomerados na superfície. A formação de buracos se dá pela liberação

de gases durante a síntese do material, e se agrava pela calcinação do material na fase final, que promove a melhoria da cristalinidade do material, fato esse que pode ser observado nos resultados de DRX. Após a calcinação, partículas menores se aglomeram, formando, por sua vez, partículas de tamanho maior (SRINATHA et al., 2022).

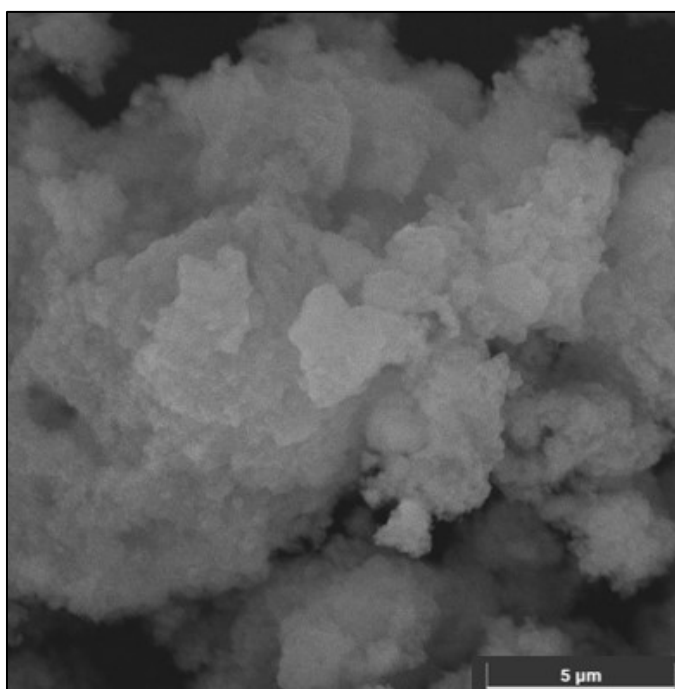
Figura 14 - Análise da superfície de a) ZnAl_2O_4 b) $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$ c) Co_3O_4 por MEV



Fonte: Autoria própria (2023).

Para a Figura 14c, temos partículas de tetróxido de cobalto de tamanhos irregulares e formato esfericizado. A análise minuciosa da micrografia revela que o tamanho dessas partículas é de aproximadamente 100 nm, variando para mais ou menos (MEDINA et al., 2019). As imagens de micrografia da união de ambos compostos (Figura 14b - ZnAl_2O_4) mostram um material particulado, com tamanhos e formas variados.

Na Figura 15 é possível observar mais claramente os desenhos irregulares das partículas de $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$, que chegam a medir 1 µm.

Figura 15 - Análise da superfície de $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$ 

Fonte: Autoria própria (2023).

A análise realizada por fluorescência de raios X (FRX), mostrada na Tabela 2, revelou aumento da quantidade de átomos de zinco, enquanto a quantidade de oxigênio foi reduzida para as amostras de aluminato de zinco impregnadas ou não com óxido de cobalto, quando comparamos com o valor teórico, não apresentando grandes alterações nos valores do alumínio. Esse fenômeno foi igualmente observado por Srinatha et al. (2022). O estudo mostra que o aumento do zinco, seguido da diminuição do oxigênio é causado pela calcinação do material.

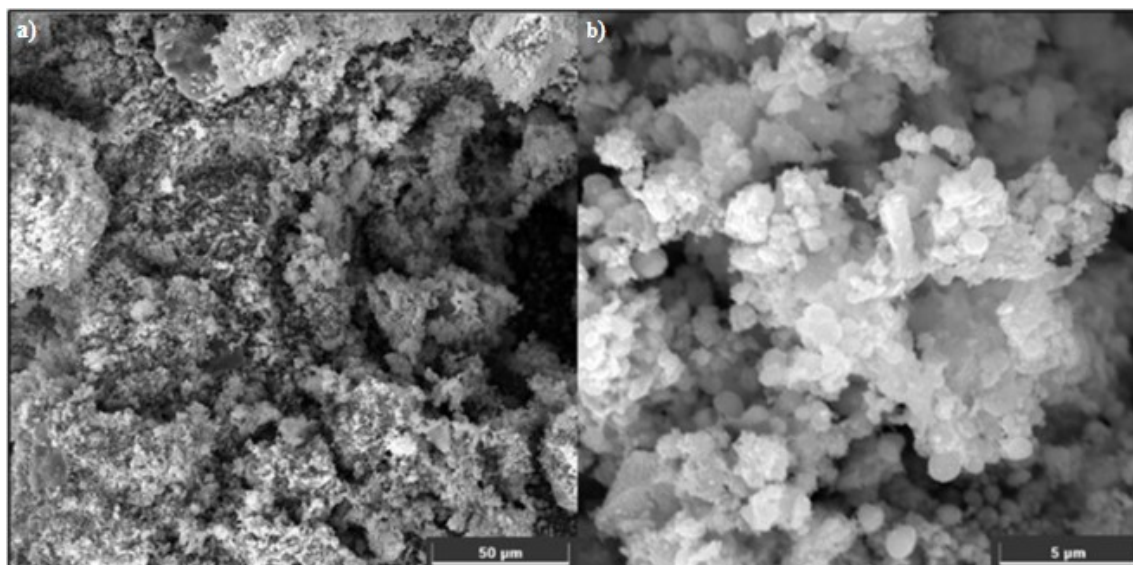
Tabela 2 - Valores da análise elementar obtidos de (FRX) e teóricos para amostras de ZnAl_2O_4 , Co_3O_4 e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$

Compósito	Elemento	Teórico (%)	Experimental (%)
Co_3O_4	Co	100,00	96,03
	Zn	52,16	68,06
ZnAl_2O_4	Al	23,92	31,53
	Zn	25,40	49,07
$\text{ZnAl}_2\text{O}_4 - \text{Co}_3\text{O}_4$	Al	23,30	9,57
	Co	51,30	41,11

Fonte: Autoria própria (2023).

A morfologia da superfície das cobaltitas níquel-zinco mistas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em conjunto com a análise elementar por EDX (Tabela 3) dos materiais obtidos (Figura 16).

Figura 16 – Análise da superfície de $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$ por MEV



Fonte: Autoria própria (2023).

Pelas imagens obtidas pode-se notar que as partículas possuem em geral forma esférica com distribuição irregular, devido a formação de agregados e com tamanhos abaixo de 1 μm , alcançando escala nanométrica. Resultados semelhantes foram obtidos por Benhebal *et al.* (2019) na síntese de ZnCo_2O_4 pelo método sol-gel, também verificados por Yulizar *et al.*, (2022) para as partículas NiCo_2O_4 .

A Tabela 3 – Valores da análise elementar obtidos de (EDX) e teóricos para amostras de $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$ apresenta os valores em porcentagem de massa teóricos e experimentais, obtidos por espectroscopia de raios X (EDX).

Tabela 3 – Valores da análise elementar obtidos de (EDX) e teóricos para amostras de $\text{Ni}_{0.5}\text{Zn}_{0.5}\text{Co}_2\text{O}_4$

Elemento	Teórico (%)	Experimental (%)
Ni	12,03	10,85
Zn	13,40	11,29
Co	48,33	42,51
O	26,23	10,48

Fonte: Autoria própria (2023).

A análise de EDX mostra a presença quantitativa de níquel, zinco, cobalto e oxigênio na amostra e deixa clara a ausência de impurezas. Os valores obtidos pela análise elementar se assemelham ao teórico, com exceção do oxigênio, que apresentou quase metade do valor esperado. Tal resultado pode ser justificado pela metodologia de produção das partículas, que envolve a etapa de calcinação, possível razão para perda de oxigênio.

1.14.4 Análise por fisissorção de N₂

A área específica de superfície e o tamanho médio dos poros dos materiais obtidos foram investigados utilizando BET e os resultados são apresentados na Tabela 4. Com base nos dados obtidos, podemos concluir que a melhor área superficial é encontrada no óxido de cobalto (Co₃O₄), sendo 141,91 m² g⁻¹, tendo estrutura microporosa, com poros de 3,47 nm de diâmetro. É possível observar que a área superficial obtida para os óxidos misturados a Celite têm um aumento proporcional à quantidade de óxido no compósito, sendo maior a área para menor quantidade de Celite, uma vez que essa possui pouca área superficial.

Tabela 4 - Resultados obtidos por BET

Amostra	Área / m ² g ⁻¹	Diâmetro do poro/nm	Área de poro/m ² g ⁻¹ (Tipo de poro)
Celite	8,61	3,19	Não poroso
Co ₃ O ₄	141,91	3,47	34,32 (Microporoso)
Co ₃ O ₄ :Ce 1:1,00	16,46	3,62	Não poroso
Co ₃ O ₄ :Ce 1:0,50	36,89	3,78	Não poroso
Co ₃ O ₄ :Ce 1:0,25	49,90	2,77	Não poroso
ZnAl ₂ O ₄	43,75	5,68	Não poroso
ZnAl ₂ O ₄ - Co ₃ O ₄	69,96	3,46	16,68 (Microporoso)
ZnCo ₂ O ₄	44,01	8,14	Não poroso
NiCo ₂ O ₄	59,03	5,44	Não poroso
Ni _{0,5} Zn _{0,5} Co ₂ O ₄	20,55	10,81	Não poroso

Fonte: Autoria própria (2023).

O mesmo pode ser observado para o óxido de cobalto impregnado com aluminato de zinco, que possui pouca área superficial (43,75 m² g⁻¹), melhorada com a adição da cobaltita, e passa a exibir estrutura microporosa após a incorporação, com poros de 3,46 nm de diâmetro.

Já para as cobaltitas substituídas, é possível perceber a diminuição da área superficial após a substituição parcial do sítio A, porém demonstrando aumento no diâmetro dos poros. Dois máximos de distribuições de tamanho de poro são obtidos em 8,14 e 10,81 nm, para a cobaltitas de zinco e para a disubstituída, respectivamente.

De maneira geral, a calcinação à altas temperaturas, como no caso de ZnAl₂O₄, ZnCo₂O₄, NiCo₂O₄, e Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄ pode levar a uma diminuição acentuada na área de superfície específica devido ao grave colapso dos poros e sinterização durante o processo.

1.15 Imobilização da Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01

1.15.1 Seleção dos melhores suportes

A Tabela 5 apresenta os dados obtidos na seleção dos suportes que serão estudados na imobilização de lipases por planejamentos fatoriais, variando-se tempo de contato e temperatura.

Tabela 5 – Resultados da triagem de imobilização

Suportes	Atividade enzimática (U g _{suporte} ⁻¹)
Celite	257,55 ± 63,81
Co ₃ O ₄	181 ± 23,4
Co ₃ O ₄ :Celite/1:1,00	293 ± 15,0
Co ₃ O ₄ :Celite/1:0,50	359 ± 14,3
Co ₃ O ₄ :Celite/1:0,25	287 ± 39,3
ZnAl ₂ O ₄	146 ± 11,7
ZnAl ₂ O ₄ - Co ₃ O ₄	120,02 ± 32,97
NiCo ₂ O ₄	221 ± 21,5
ZnCo ₂ O ₄	191 ± 5,20
Ni _{0,5} Zn _{0,5} Co ₂ O ₄	493 ± 38,5

Fonte: Autoria própria (2023).

Os resultados mais satisfatórios foram observados para as Cobaltitas com o sítio A substituídos por níquel e zinco (Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄), apresentando atividade enzimática média de 493 U g_{suporte}⁻¹.

Para as nanopartículas de cobalto com Celite, o melhor resultado foi obtido para Co₃O₄:Celite/1:0,50, com atividade média de 359 ± 14,3 U g_{suporte}⁻¹. É possível notar o aumento da atividade enzimática quando comparamos a nanopartícula de cobalto com e sem a incorporação de Celite, que aumentou cerca 60% para a adição de 1,00 g (de 181 para 293 U g_{suporte}⁻¹), se assemelhando ao valor apresentado para as lipases imobilizadas apenas no silicato (257,55 U g_{suporte}⁻¹). Esse aumento pode estar associado à dispersão das nanopartículas magnéticas, possivelmente aglomeradas devido à magnetização, após a incorporação da Celite. Além disso, podemos explicar o maior valor de atividade na proporção de 0,50 devido à maior

área superficial em comparação com as outras proporções adicionadas às nanopartículas, observadas na análise por BET.

Já para as lipases imobilizadas no aluminato de zinco e no compósito contendo óxido de cobalto, não houve grande diferença na atividade enzimática média entre os dois suportes ($146 \pm 11,7$ e $120,02 \pm 32,97$ U g_{suporte}⁻¹, respectivamente), sendo preferível aquele com maior capacidade magnética.

Sendo assim, os suportes escolhidos para serem estudados mais profundamente foram as cobaltitas Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄ e o compósito ZnAl₂O₄ - Co₃O₄.

1.15.2 Avaliação da Imobilização da Lipase de *Botryosphaeria ribis* EC-01 de Acordo com Planejamentos Fatoriais

A imobilização de lipases em partículas Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄ (Ni-Zn-Co) e em nanopartículas magnéticas de ZnAl₂O₄ - Co₃O₄ (NPs Zn-Al-Co) foi realizada de acordo com planejamentos fatoriais 2² com pontos axiais e triplicata no ponto central.

A Tabela 6 apresenta os resultados obtidos a partir dos planejamentos desenvolvidos para a imobilização de lipases de *B. ribis* EC-01 em Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄ (Ni-Zn-Co) e ZnAl₂O₄-Co₃O₄ (Zn-Al-Co).

Tabela 6 - Planejamento fatorial (2²) composto central rotacional para a avaliação da imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄ e ZnAl₂O₄-Co₃O₄

Experimento	Variáveis codificadas		Respostas		
	X ₁	X ₂	U g _{Ni-Zn-Co} ⁻¹	U g _{Zn-Al-Co} ⁻¹	
1	-1	-1	801	124	
2	-1	1	607	108	
3	1	-1	380	264	
4	1	1	381	311	
5	-1,41	0	613	197	
6	1,41	0	313	559	
7	0	-1,41	447	43,1	
8	0	1,41	462	178	
9	0	0	330	268	
10	0	0	363	292	
11	0	0	324	244	
Fatores	Níveis reais				
	-1,41	-1	0	1	1,41
X ₁ (tempo, min)	15	24	45	66	75
X ₂ (temperatura, °C)	15	19	30	41	45

Fonte: Autoria própria (2023).

A imobilização utilizando como suporte Ni-Zn-Co alcançou 801 U g_{Ni-Zn-Co}⁻¹ no tempo de 24 minutos e temperatura de 19 °C. É possível verificar ainda que para o tempo de 66 minutos (experimentos 3 e 4) a temperatura não exerceu influência, uma vez que as atividades a 19 °C e 41 °C foram semelhantes (380 U g_{Ni-Zn-Co}⁻¹ e 381 U g_{Ni-Zn-Co}⁻¹, respectivamente).

O efeito linear da variável temperatura não significativo ($p = 0,101067$) pode ser verificado na equação preditiva quadrática (Equação 3) para a imobilização de lipases de *B. ribis* EC-01 em Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄. Nesta equação os termos em negrito são significativos ($p \leq 0,05$).

$$U_{g_{Ni-Zn-Co}^{-1}} = \mathbf{338,7} - \mathbf{134,1}X_1 + \mathbf{83,33}X_1^2 - 21,62X_2 + \mathbf{79,15}X_2^2 + \mathbf{48,50}X_1X_2 \quad (3)$$

Os termos lineares e quadráticos para a variável tempo (X_1) foram significativos ($p \leq 0,05$). Já para a variável temperatura (X_2) foi significativo ($p \leq 0,05$) somente o termo quadrático, assim como sua interação com a variável tempo ($X_1 X_2$).

A análise de variância (ANOVA) para a imobilização neste suporte, considerando apenas os termos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$), está apresentada na Tabela 7, em que é possível verificar a confiabilidade do modelo, que exibe $R^2 = 0,89$ e $F_{calc} > F_{tab}$ para o modelo e $F_{calc} < F_{tab}$ para a falta de ajuste.

Tabela 7- Análise de variância (ANOVA) para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄.

Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F _{calc}	F _{list}
U g _{Ni-Zn-Co} ⁻¹	Regressão	213894,9	4	53473,7	^a 12,25	4,53
	Resíduo	26193,5	6	4365,58		
	Falta ajuste	25308,3	4	6327,07	^b 14,3	19,24
	Erro puro	885,2	2	442,6		
	Total	240088,4	10			

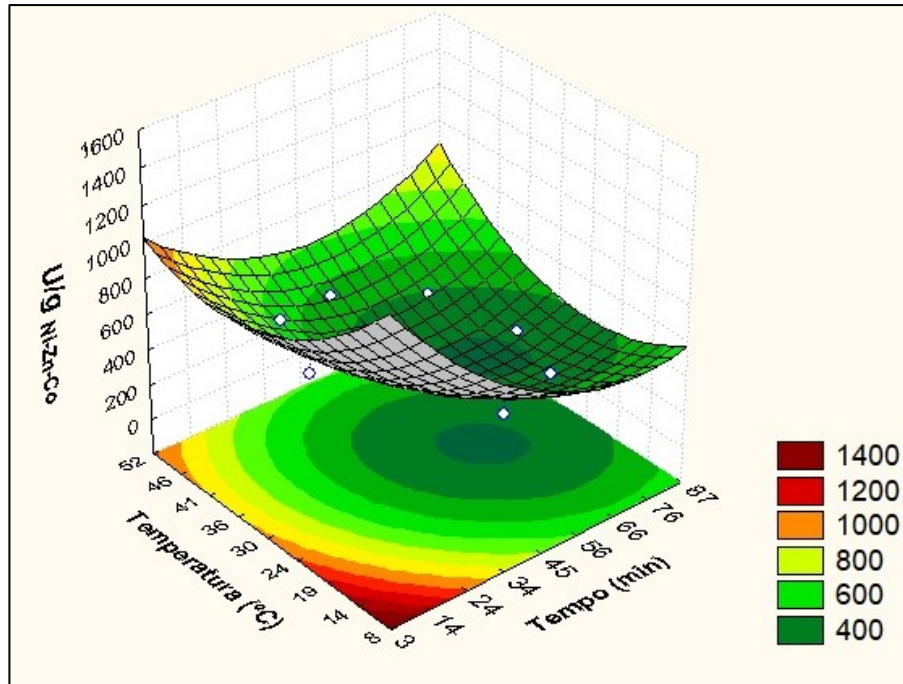
$$R^2=0,89; \text{ }^aF 95\%4,6; \text{ }^bF 95\%4,2$$

Fonte: Autoria própria (2023)

A Figura 17 apresenta a curva tridimensional gerada para este modelo, mostrando a interação entre as variáveis. É possível notar que menores tempos e temperaturas podem favorecer a imobilização neste suporte, podendo alcançar a atividade de 1400 U g_{Ni-Zn-Co}⁻¹. No entanto, tempos acima de 24 minutos desfavorecem o processo. Isto pode ser devido a formação

de ligações indesejáveis, ou até mesmo a lixiviação da enzima sobre o suporte, uma vez que a interação entre ambos é de adsorção.

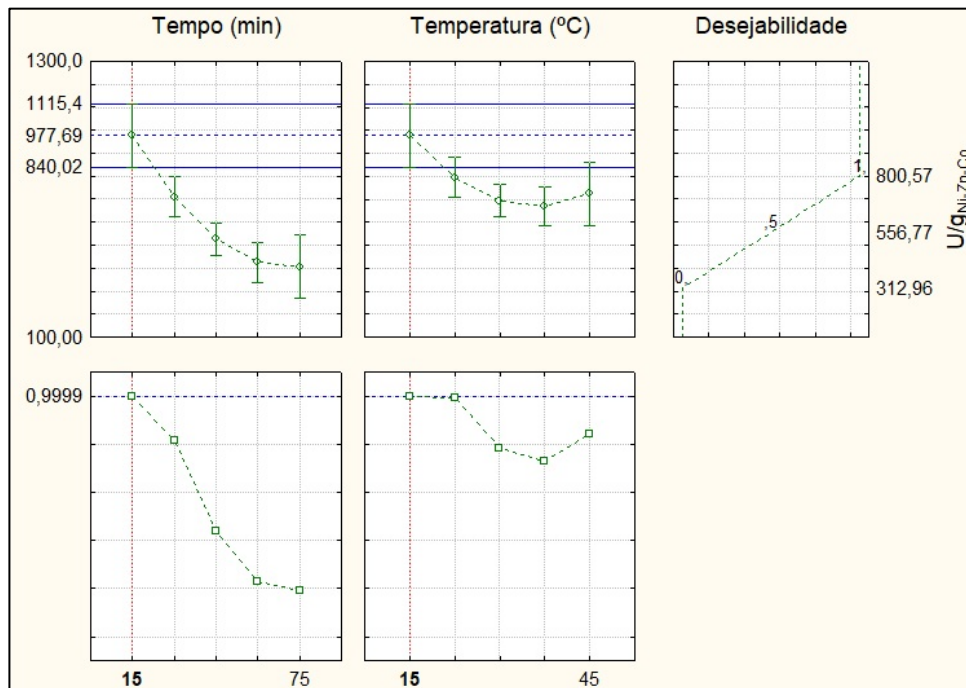
Figura 17 - Superfície de resposta para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

De acordo com o perfil de desejabilidade apresentado na Figura 18, a condição ideal para este modelo de 2^a ordem, para as variáveis tempo e temperatura, é de 15 minutos e 15 °C, respectivamente. O modelo aponta que nesta condição, a atividade enzimática neste suporte é de 977,69 U g_{Ni-Zn-Co}⁻¹ com 0,9999 % de confiança. A condição ótima apontada pelo modelo foi avaliada experimentalmente e um resultado de 1054 ± 320 U g_{Ni-Zn-Co}⁻¹ foi alcançado, validando, desta forma, o modelo.

Figura 18 - Perfil de desejabilidade para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

Tempos de contato tão curtos para imobilização de lipases em suportes análogos ainda não foram relatados, o que faz deste material um suporte promissor em termos de economia, uma vez que exige menor consumo de energia, alcançando altos níveis de atividade enzimática, com baixa temperatura e menor tempo de reação. Entretanto, Zhang et al., (2023), observou que em apenas 30' de tempo de contato a lipase de *Candida antarctica* apresentou máxima adsorção quando em contato com a lignina.

A Tabela 6 mostra, também, os resultados obtidos na imobilização de lipases de *B. ribis* EC-01 em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$. Os resultados variaram de 43,1 a 559 $\text{U g}_{\text{Zn-Al-Co}}^{-1}$, sendo este último tendo sido alcançado no tempo de 75 minutos e temperatura de 30 °C, revelando diferença nas condições apontadas na imobilização com o suporte Ni-Zn-Co.

A equação preditiva quadrática (Equação 4) para este modelo é mostrada abaixo, onde os termos em negrito são significativos ($p \leq 0,1$).

$$Ug_{\text{Zn-Al-Co}}^{-1} = 268,50 + 107,1X_1 + 44,40X_1^2 + 27,94X_2 - 90,05X_2^2 + 15,78X_1X_2 \quad (4)$$

Neste modelo os termos lineares e quadráticos de tempo (X_1) e temperatura (X_2) são significativos ($p \leq 0,1$), porém sua interação (X_1X_2) não apresentou efeito significativo ($p = 0,320956$) ao nível de 99 % de significância.

A atividade enzimática cresceu de 197 para 559 U $g_{Zn-Al-Co}^{-1}$ nos experimentos 5 e 6, respectivamente, aumentando em até três vezes a quantidade de enzima imobilizada, evidenciando o efeito significativo positivo do tempo, que passou de 15 para 75 minutos. Já o efeito significativo ($p \leq 0,1$) da temperatura pode ser verificado nos experimentos 7 e 8, onde a atividade enzimática aumentou mais que quatro vezes o seu valor quando a temperatura mudou de 15 para 45 °C.

A análise de variância (ANOVA) para a imobilização em $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$, considerando apenas os termos estatisticamente significativos ($p \leq 0,1$), é apresentada na Tabela 8. Também é possível verificar que este modelo é confiável e estatisticamente significativo ($p \leq 0,1$), exibindo $R^2 = 0,94$ e $F_{calc} > F_{tab}$ para o modelo e $F_{calc} < F_{tab}$ para a falta de ajuste.

Tabela 8 - Análise de variância (ANOVA) para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$

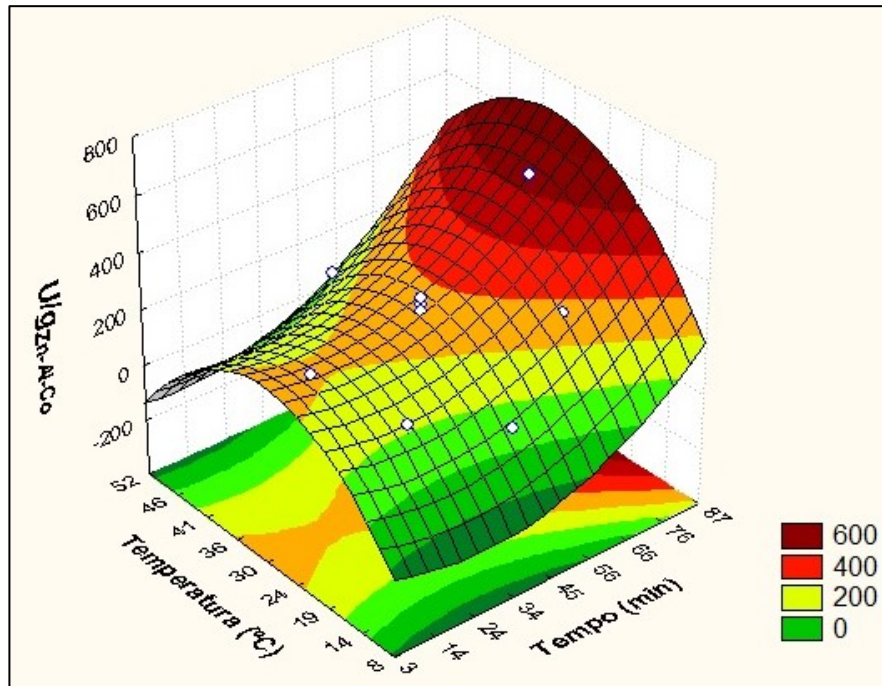
Resposta	Fonte de variação	Soma Quadrados (SS)	Graus de Liberdade (DF)	Média Quadrados (MS)	F teste	
					F_{calc}	F_{list}
U $g_{Zn-Al-Co}^{-1}$	Regressão	174703,3	4	43675,8	^a 22,57	3,18
	Resíduo	11610,4	6	1935,07		
	Falta ajuste	10446,3	4	2611,58	^b 4,49	9,24
	Erro puro	1164,1	2	582,05		
	Total	186313,7	10			

$R^2=0,94$; ^a F 90%4,6; ^b F 90%4,2

Fonte: Autoria própria (2023).

Na Figura 19 é apresentada a curva tridimensional gerada para o modelo mostrando as interações entre as variáveis tempo e temperatura na imobilização utilizando o suporte $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$. Como pode ser verificado, o aumento do tempo é favorável na imobilização de lipases de *B. ribis* EC-01 neste suporte. Com relação à temperatura, valores próximos ao de 30 °C favorecem o processo. Esta tendência pode ser verificada no perfil de desejabilidade mostrado na Figura 20.

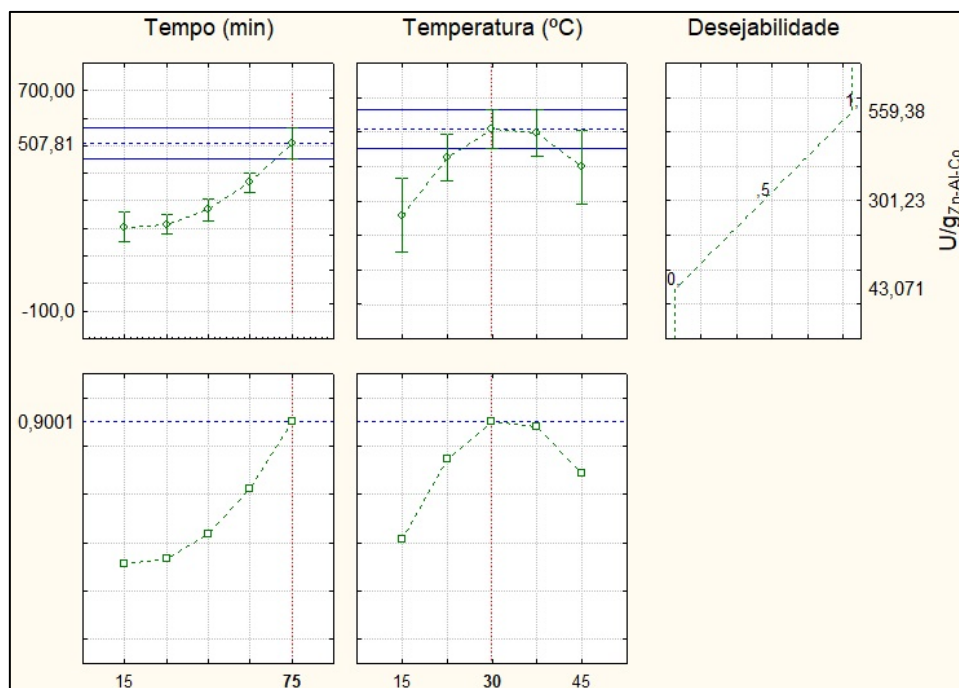
Figura 19 - Superfície de resposta para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em $ZnAl_2O_4-CO_3O_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

O perfil de desejabilidade para a imobilização neste suporte (Figura 20) demonstra que as condições ideais de tempo e temperatura pelo modelo foi de 75 minutos e 30 °C, respectivamente, com atividade de $507,81 \text{ U g}_{Zn-Al-Co}^{-1}$ e 0,9001 % de confiança. Esta condição foi avaliada experimentalmente e uma atividade de $826 \pm 32,6$ foi alcançada.

Figura 20 - Perfil de desejabilidade para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 em $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

Aghabeigi et al., (2023) relatou em seus estudos que o aumento do tempo de contato entre a lipase de *Candida rugosa* e as nanopartículas magnéticas de ferrita de níquel em óxido de grafeno ($NiFe_2O_4-GO$), com um máximo de 2 h, promoveu maior eficiência de imobilização. Ainda que a interação enzima-suporte seja mais alta nos primeiros estágios, maiores tempos ajudam a estabilizar a enzima no suporte.

Além disso, a diferença nos tempos de imobilização entre os dois suportes pode ser explicada pela capacidade magnética do compósito $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$, que tende a causar aglomeração do mesmo (AGHABEIGI et al., 2023), e, posterior, dispersão ao decorrer do tempo de reação, o que facilita a interação enzima-suporte. Efeito não observado para as cobaltitas Ni-Zn-Co, que se chocam com mais facilidade com as lipases nos primeiros instantes do contato.

1.16 Parâmetros físico-químicos das lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01 imobilizadas nos melhores suportes

Quando aplicadas à processos industriais, as enzimas são submetidas a reações conduzidas em diferentes tempos e temperaturas, na presença, ou não, de solventes orgânicos, como o etanol e o glicerol, quando usadas para produção de biodiesel, por exemplo. Para esse fim, foram realizados ensaios de estabilidade a fim de investigar os efeitos da temperatura e de solventes na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$ para futuras aplicações.

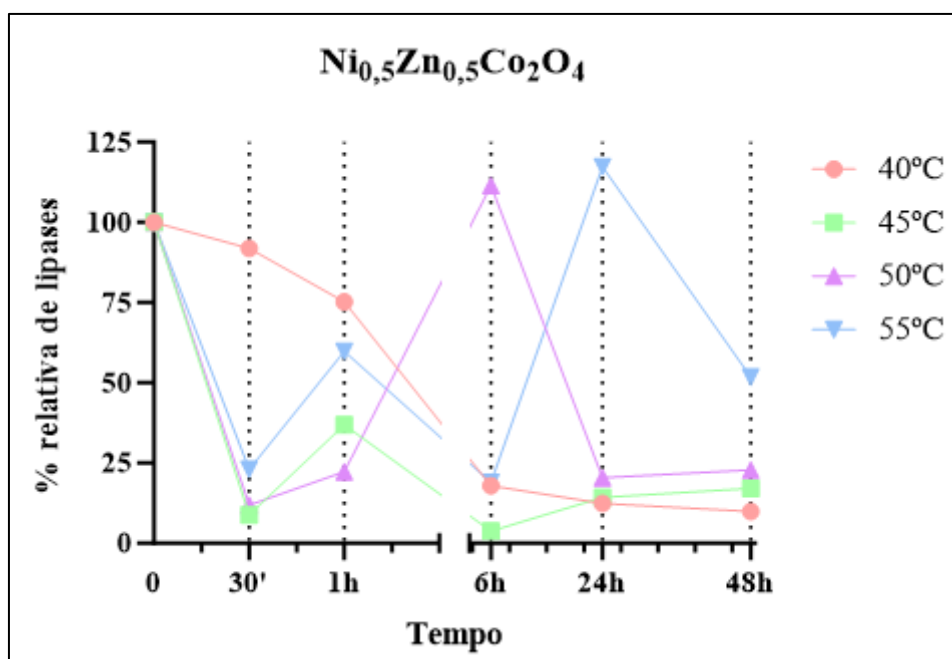
1.16.1 Estabilidade térmica das lipases imobilizadas

Os resultados dos ensaios de estabilidade térmica das enzimas imobilizadas nas cobaltitas Ni-Zn-Co e nas partículas Zn-Al-Co, testadas nas temperaturas de 40 a 55 °C, são apresentados na Figura 21 e Figura 22, respectivamente.

As lipases imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ apresentaram maior estabilidade na temperatura de 55 °C, com um pico de ativação em 24 h, apresentando mais de 100 % da atividade inicial da enzima. Algo semelhante pode ser observado para a temperatura de 50 °C em 6 h (111%).

Na temperatura de 40 °C a enzima imobilizada nesse mesmo suporte se manteve bem ativa na primeira hora, apresentando até 90 % da atividade inicial, tendo diminuído sua atividade gradualmente no decorrer do tempo de incubação, atingindo, aproximadamente, 30 % ao final das 48 h.

Figura 21 - Efeito da temperatura na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$

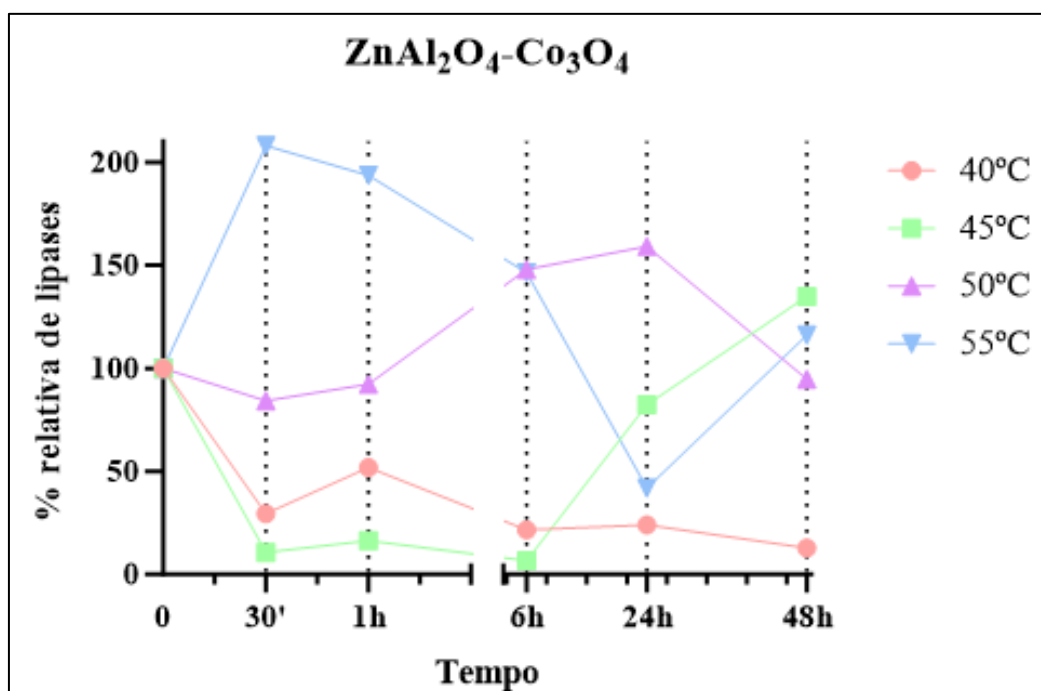


Fonte: Autoria própria (2023).

As partículas de aluminato de zinco com óxido de cobalto, por apresentarem característica magnética, tendem a se aglomerar, antes e após a imobilização de lipases, podendo diminuir os sítios livres das enzimas, o que reduz a eficiência catalítica no meio de reação (AGHABEIGI et al., 2023). Sendo assim, tempos de reação maiores tendenciam a dispersão desses biocatalisadores, deixando livres os sítios ativos das lipases imobilizadas, promovendo catálise de um maior número de substratos.

Tal fato pode explicar a crescente atividade das enzimas imobilizadas em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$, incubadas a 45 e 50 °C, acima de 6 h, que mostraram 135% da atividade inicial para a temperatura de 45 °C durante 48 h de incubação, e 159 % para 50 °C após 24 h, como pode ser observado na Figura 22. Na primeira hora da incubação a 55 °C, as enzimas imobilizadas nesse suporte, alcançaram acima de 200 % da atividade inicial e mantiveram sua atividade acima de 100 % ao fim do tempo de reação, sendo 116 % em 48 h.

Figura 22 - Efeito da temperatura na estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

Ao compararmos os resultados obtidos nos dois suportes, é possível perceber que o suporte Zn-Al-Co apresenta melhor desempenho em relação a Ni-Zn-Co. No entanto, ambos demonstram ativação da enzima nas temperaturas de 50 e 55°C, que podem ser explicadas pelo fato de essas serem consideradas temperaturas ótimas para a lipase, ou seja, é a faixa de temperatura em que a enzima tem maior eficiência (PENG et al., 2023).

Outros estudos, utilizando as lipases produzidas por *B. ribis* EC-01, demonstraram que essa mesma enzima imobilizada adquire maior estabilidade e menor sensibilidade às temperaturas (ANDRADE et al., 2013).

1.16.2 Efeito de solventes orgânicos nas lipases imobilizadas

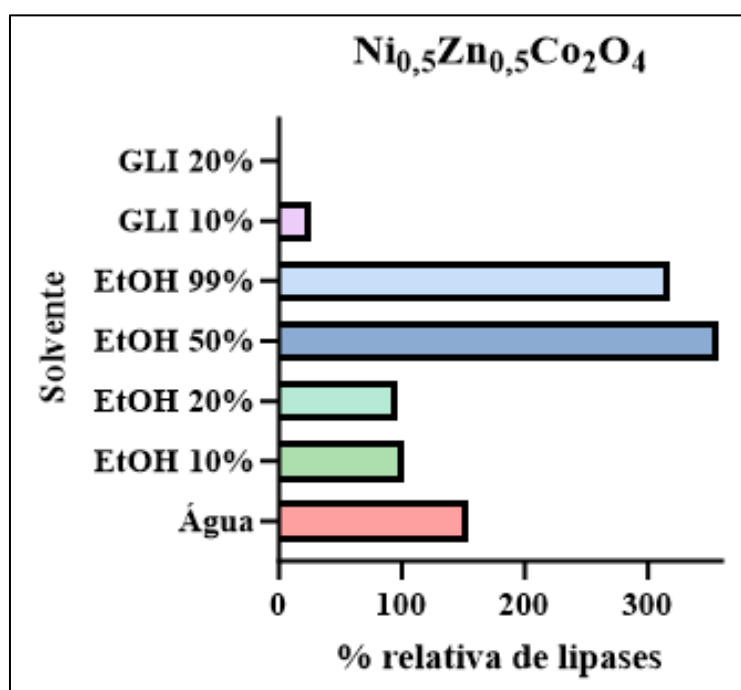
A estabilidade das lipases imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$ foi investigada em água destilada, etanol (10, 20, 50 e 99%) e glicerol (10 e 20%) e os resultados obtidos foram apresentados nas figuras a seguir.

As interações água-enzima, essenciais para a atividade da enzima, podem ser afetadas pela presença de solventes orgânicos polares como metanol e etanol, no entanto, também pode haver influência da cadeia carbônica dos solventes sobre as enzimas.

As lipases apresentaram boa estabilidade em etanol em todas as proporções, entretanto é possível notar, pelos resultados mostrados nas figuras, o aumento da atividade residual, principalmente, na concentração de 50 %, alcançando 357 % para o suporte Ni-Zn-Co e 165 % para ZnAl₂O₄-Co₃O₄.

Quando imobilizadas nas cobaltitas Ni-Zn-Co (Figura 23), as lipases se mantiveram estáveis, também, na concentração de 99 % de etanol, com atividade residual bem próxima a mostrada em 50 %, sendo 317 % da atividade inicial. Nas proporções de 10 e 20 % houve uma queda na atividade das lipases, ainda que esses valores sejam altos, sendo 154 e 101% da atividade inicial.

Figura 23 – Efeito do solvente na estabilidade das lipases imobilizadas em Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co₂O₄

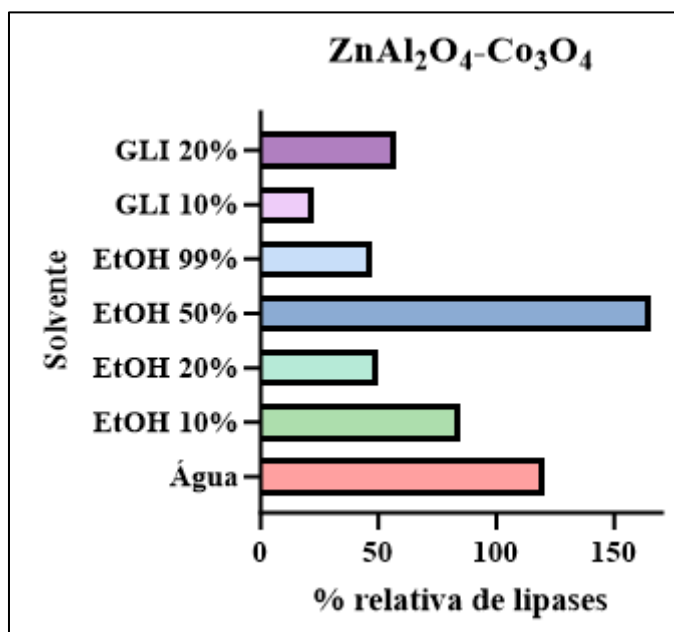


Fonte: Autoria própria (2023).

O glicerol, subproduto da transesterificação de óleos para produção de biodiesel, não manteve a enzima imobilizada nas cobaltitas estável nas concentrações de 10 e 20 % (26 e 0,85%). Esse fenômeno pode ser explicado pela aglutinação da água no sistema de reação, o que inativa a enzima (FENG et al., 2023). Já a água, acresceu em 54 % da atividade inicial da enzima (154 %).

Na Figura 24 podemos observar os efeitos dos solventes para as lipases immobilizadas nas partículas magnéticas Zn-Al-Co. O resultado observado para água, que demonstrou 120 % da atividade inicial da enzima immobilizada nos planejamentos experimentais, pode ser explicada pela melhor dispersão das partículas magnéticas, deixando os sítios ativos da enzima mais livres para interação com o substrato. Para o etanol a 20 % e 99 %, a enzima se manteve cerca de 50 % ativa, já na proporção de 10 %, a mesma manteve atividade acima de 80 % ao final de 1 h.

Figura 24 - Efeito do solvente na estabilidade das lipases immobilizadas em $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$



Fonte: Autoria própria (2023).

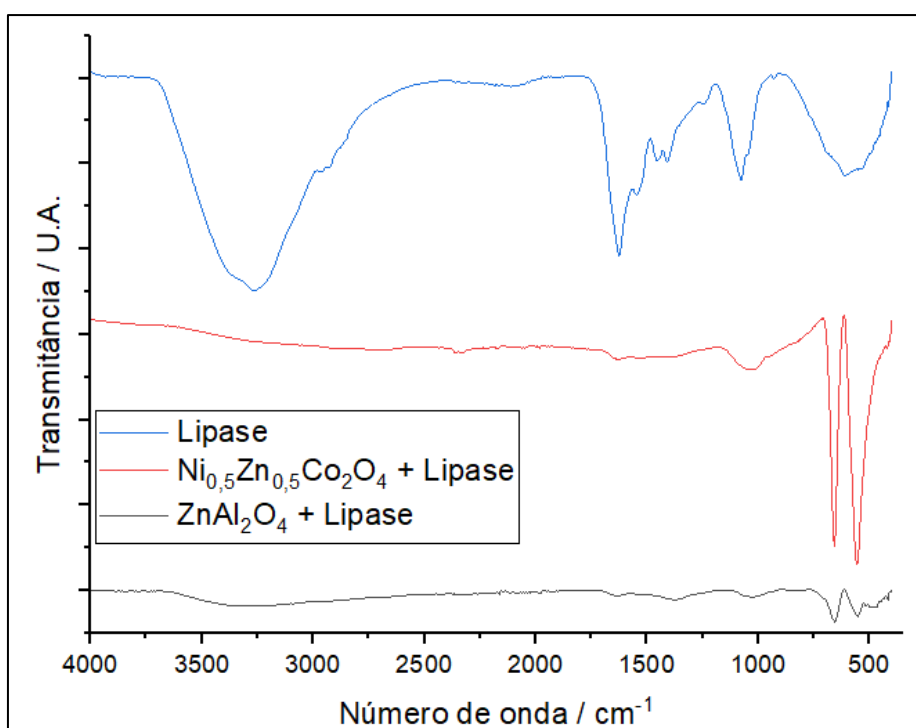
O sistema contendo 100 % de água destilada, manteve, para a enzima ativa nesse suporte, a atividade inicial em 120 %. Esse comportamento, comum aos dois suportes, se dá ao fato de que a água manteria, então, a conformação catalítica das enzimas ativa (FENG et al., 2023).

1.17 Caracterização dos suportes após imobilização

As lipases immobilizadas nos melhores suportes definidos pela triagem ($Ni_{0,5}Zn_{0,5}Co_2O_4$ e $ZnAl_2O_4-Co_3O_4$), assim como as lipases livres foram caracterizadas por espectroscopia de infravermelho (FTIR), de acordo com a Figura 25. Individualmente, o espectro da lipase exibe

bandas característicos dos grupos funcionais dos aminoácidos presentes na estrutura das proteínas existentes em sua composição. Bandas de absorção em 1625 cm^{-1} , 1550 cm^{-1} e 1230 cm^{-1} , correspondem às ligações dos grupamentos amida dos tipos I, II e III, associadas às vibrações das ligações C=O, C-N e N-H presentes nos polipeptídios. Há estiramentos de grupamentos hidroxila na região $3400\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ e presença de grupos amino em 1450 cm^{-1} . Além disso, a banda aparente em 1070 cm^{-1} pode ser atribuída ao grupo C–O–C (AGHABEIGI et al., 2023a; KHAN et al., 2019; ZHANG et al., 2023).

Figura 25 - Análise FTIR das lipases e das partículas após imobilização de lipases



Fonte: Autoria própria (2023).

Após a imobilização é possível perceber que há perda dos sinais no espectro referente aos grupos funcionais das lipases, que pode ser explicado pela fixação das mesmas nos suportes, o que diminui as vibrações das ligações da mesma.

CONCLUSÃO

Dos dez suportes testados para a imobilização de lipases de *Botryosphaeria ribis* EC-01, as partículas $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ receberam atenção especial por exibirem bons resultados de atividade enzimática após a imobilização ($493 \pm 38,5$). Os resultados de FTIR e DRX comprovaram a síntese de uma cobaltita dissubstituída, com estrutura espinélio, enquanto o BET sinalizou a existência de área superficial relativamente baixa, entretanto com alto diâmetro de poros em relação aos outros suportes, o que pode explicar os dados obtidos para a atividade da enzima nesse suporte.

A imobilização de lipases nos melhores suportes foi avaliada por planejamentos fatoriais e análise por superfície de resposta, avaliando tempo e temperatura. O modelo estatístico apontou que em condições ideais, a atividade da enzima imobilizada em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ seria de $977,69 \text{ U g}_{\text{Ni-Zn-Co}}^{-1}$. A condição ótima foi avaliada experimentalmente e um resultado de $1054 \pm 320 \text{ U g}_{\text{Ni-Zn-Co}}^{-1}$ foi alcançado, a 15°C e em, apenas 15 minutos, mostrando que o modelo é estatisticamente válido.

O compósito $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$ também foi escolhido para ser avaliado por planejamentos experimentais, mesmo com resultados de imobilização parecidos com os valores obtidos para ZnAl_2O_4 e Co_3O_4 , separadamente, durante a triagem, se sobressaiu devido ao magnetismo e boa área superficial ($69,96 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), com característica microporosa. Para este material, o modelo apontou como condições ideais para imobilização 75 minutos e 30°C . Os experimentos nestas condições alcançaram atividade de $826 \pm 32,6 \text{ U g}_{\text{Zn-Al-Co}}^{-1}$, sendo o valor predito de $507,81 \text{ U g}_{\text{Zn-Al-Co}}^{-1}$, validando o modelo.

As lipases imobilizadas nestes suportes foram avaliadas em temperaturas de 40 a 55°C , alcançando boa estabilidade em até 6 h (50°C) e 24 h (55°C) para a enzima imobilizada em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ e estabilidade de 48 h em temperaturas de 45 a 55°C para a enzima imobilizada em $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$. Referente a estabilidade em solventes foram estáveis em água e em etanol até 99 % (v/v) e 50 % (v/v) no caso das enzimas imobilizadas em $\text{Ni}_{0,5}\text{Zn}_{0,5}\text{Co}_2\text{O}_4$ e $\text{ZnAl}_2\text{O}_4\text{-Co}_3\text{O}_4$, respectivamente.

As lipases, produzidas por *Botryosphaeria ribis* EC-01 em condição de fermentação submersa, imobilizadas nestes dois materiais, constituem biocatalisadores com elevada atividade enzimática e estáveis nas condições testadas, sendo promissoras para diversas aplicações industriais.

REFERÊNCIAS

- ABOL-FOTOUH, D.; ALHAGAR, O. E. A.; HASSAN, M. A. Optimization, purification, and biochemical characterization of thermoalkaliphilic lipase from a novel *Geobacillus stearothermophilus* FMR12 for detergent formulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 181, p. 125–135, 30 jun. 2021.
- AGHABEIGI, F. *et al.* Immobilization of lipase on the graphene oxides magnetized with NiFe₂O₄ nanoparticles for biodiesel production from microalgae lipids. **Process Biochemistry**, v. 126, p. 171–185, 1 mar. 2023.
- AMENAGHAWON, A. N. *et al.* Enhanced lipase production from a ternary substrate mix of agricultural residues: A case of optimization of microbial inducers and global sensitivity analysis. **Bioresource Technology Reports**, v. 17, p. 101000, 1 fev. 2022.
- AMIRI, M.; ESKANDARI, K.; SALAVATI-NIASARI, M. Magnetically retrievable ferrite nanoparticles in the catalysis application. **Advances in Colloid and Interface Science**. Elsevier B.V., 1 set. 2019.
- ANDRADE, M. M. *et al.* Lipase production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on soybean and castorbean meals: Optimization, immobilization, and application for biodiesel production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 170, n. 7, p. 1792–1806, ago. 2013.
- ANDRADE, M. M. *et al.* Lipase Production by *Botryosphaeria ribis* EC-01 on Soybean Meal Supplemented with Amino Acids, and Some Physicochemical Properties of the Enzyme. **Orbital: Electronic Journal of Chemistry**, v. 6, n. 3, p. 169-177, set. 2014.
- ARYA, P. S. *et al.* Valorization of agro-food wastes: Ease of concomitant-enzymes production with application in food and biofuel industries. **Bioresource Technology**, v. 361, p. 127738, 1 out. 2022.
- ASHOK, A.; KENNEDY, L. J. Magnetically Separable Zinc Ferrite Nanocatalyst for an Effective Biodiesel Production from Waste Cooking Oil. **Catalysis Letters**, v. 149, n. 12, p. 3525–3542, 1 dez. 2019.
- BALBAY, A.; SELVITEPE, N.; SAKA, C. Fe doped-CoB catalysts with phosphoric acid-activated montmorillonite as support for efficient hydrogen production via NaBH₄ hydrolysis. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 46, n. 1, p. 425–438, 1 jan. 2021.
- BAYRAMOĞLU, G. *et al.* Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372–378, jan. 2011.
- BAYRAMOĞLU, G. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic chitosan beads and application in flavor esters synthesis. **Food Chemistry**, v. 366, 1 jan. 2022.
- BERNAL, C. *et al.* Carbonaceous-siliceous composite materials as immobilization support for lipase from *Alcaligenes* sp.: Application to the synthesis of antioxidants. **Carbon**, v. 74, p. 96–103, 2014.

BHARATHI, D.; RAJALAKSHMI, G. Microbial lipases: An overview of screening, production and purification. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, Elsevier Ltd, 1 nov. 2019.

BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Chemical, physical, and biological coordination: An interplay between materials and enzymes as potential platforms for immobilization. **Coordination Chemistry Reviews**, Elsevier B.V., 1 jun. 2019.

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**. [s.l: s.n.].

CHAIBAKHSH, N.; MORADI-SHOEILI, Z. Enzyme mimetic activities of spinel substituted nanoferrites (MFe₂O₄): A review of synthesis, mechanism and potential applications. **Materials Science and Engineering**, Elsevier Ltd, 1 jun. 2019.

CHEN, Y. *et al.* Visible-light-induced photocatalytic mitigation of ibuprofen using magnetic black TiO_{2-x}/CaFe₂O₄ decorated on diatomaceous earth. **Science of the Total Environment**, Elsevier B.V., 1 abr. 2021.

CIPOLATTI, E. P. *et al.* Production of new nanobiocatalysts via immobilization of lipase B from *C. antarctica* on polyurethane nanosupports for application on food and pharmaceutical industries. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 2957–2963, 15 dez. 2020.

COLLA, L. M. *et al.* Surface response methodology for the optimization of lipase production under submerged fermentation by filamentous fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 461–467, 1 abr. 2016.

DASH, A.; BANERJEE, R. Exploring indigenously produced celite-immobilized *Rhizopus oryzae* NRRL 3562-lipase for biodiesel production. **Energy**, v. 222, 1 maio 2021.

DE ANDRADE, B. C. *et al.* Synthesis of magnetic nanoparticles functionalized with histidine and nickel to immobilize His-tagged enzymes using β -galactosidase as a model. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 184, p. 159–169, 1 ago. 2021.

DE CASTRO, T. F. *et al.* Biotechnological valorization of mycelium-bound lipase of *Penicillium purpurogenum* in hydrolysis of high content lauric acid vegetable oils. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 161, p. 498–505, 1 maio 2022.

DURÁN, N. P.; TAKAHASHI, J. A.; FORTES, I. C. P. Lyophilized biomass of *syncephalastrum racemosum* as an innovative biocatalyzer for biodiesel production. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 35–49, 2019.

FENG, K. *et al.* Effect of crude oil composition and process parameters on the catalytic performance of immobilized lipase during enzymatic deacidification of high-acid soy sauce by-product oil and its bioprocess scale-up. **LWT**, v. 182, 1 jun. 2023.

FERREIRA, T. C. da C. **Nanopartículas magnéticas de cobalto na imobilização de lipases.** Trabalho de Conclusão de Curso. Curso Superior de Licenciatura em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana. p. 56. 2019.

GRECO-DUARTE, J. *et al.* Simultaneous lipase production and immobilization: morphology and physiology study of *Penicillium simplicissimum* in submerged and solid-state fermentation with polypropylene as an inert support. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 164, 1 mar. 2023.

HOSSEINI, S. M. *et al.* Lipase-immobilized chitosan-crosslinked magnetic nanoparticle as a biocatalyst for ring opening esterification of itaconic anhydride. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 141–150, 15 mar. 2019.

ISMAIL, A. R.; KASHTOH, H.; BAEK, K. H. Temperature-resistant and solvent-tolerant lipases as industrial biocatalysts: Biotechnological approaches and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier B.V., 30 set. 2021.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1 set. 1998.

JAMKHANDE, P. G. *et al.* Metal nanoparticles synthesis: An overview on methods of preparation, advantages and disadvantages, and applications. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, Editions de Sante, 1 out. 2019.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. **Enzyme immobilization by adsorption: A review.** **Adsorption**, Kluwer Academic Publishers, 2014.

JIANG, C. *et al.* Ni_{0.5}Zn_{0.5}Fe₂O₄ nanoparticles and their magnetic properties and adsorption of bovine serum albumin. **Powder Technology**, v. 211, n. 1, p. 90–94, 25 jul. 2011.

KHAN, M. F. *et al.* A strategic approach of enzyme engineering by attribute ranking and enzyme immobilization on zinc oxide nanoparticles to attain thermostability in mesophilic *Bacillus subtilis* lipase for detergent formulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 136, p. 66–82, 1 set. 2019.

KNYAZEV, A. V. *et al.* Structural and magnetic properties of Ni-Zn and Ni-Zn-Co ferrites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 435, p. 9–14, 1 ago. 2017.

LIU, C. H. *et al.* Characterization of Burkholderia lipase immobilized on celite carriers. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 40, n. 4, p. 359–363, jul. 2009.

MAHMOUD, M. E.; EL-SHARKAWY, R. M.; IBRAHIM, G. A. A. A novel bionanocomposite from doped lipase enzyme into magnetic graphene oxide-immobilized-cellulose for efficient removal of methylene blue and malachite green dyes. **Journal of Molecular Liquids**, p. 120676, 28 out. 2022.

MAKHLOUF, S. A. *et al.* Structural, electrical and optical properties of Co₃O₄ nanoparticles. **Superlattices and Microstructures**, v. 64, p. 107–117, 2013.

- MAPOSSA, A. B. *et al.* Catalytic performance of NiFe₂O₄ and Ni_{0.3}Zn_{0.7}Fe₂O₄ magnetic nanoparticles during biodiesel production. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 4462–4476, 1 fev. 2020.
- MAROTTI, B. S. *et al.* Seleção de espécies do gênero *Penicillium* produtoras de lipase ligada ao micélio para aplicação em hidrólise de óleos vegetais. **Química Nova**, v. 40, n. 4, p. 427–435, 2017.
- MEDINA, B. *et al.* Solventless preparation of Fe₃O₄ and Co₃O₄ nanoparticles: A mechanochemical approach. **Materials Chemistry and Physics**, v. 226, p. 318–322, 15 mar. 2019.
- MESSIAS, J. M. *et al.* Screening *Botryosphaeria* species for lipases: Production of lipase by *Botryosphaeria ribis* EC-01 grown on soybean oil and other carbon sources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 426–431, dez. 2009.
- MESSIAS, J. M. *et al.* Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 213–234, 30 set. 2011.
- MOGUEI, M. R. S. *et al.* Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase through isocyanide-based multi component reaction on multi-walled carbon nanotube: application for kinetic resolution of rac-ibuprofen. **Biotechnology Reports**, v. 35, 1 set. 2022.
- PARANDI, E. *et al.* Lipase enzyme immobilized over magnetic titanium graphene oxide as catalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 173, p. 106794, 1 jun. 2023.
- PENG, Y. *et al.* Investigation into the magnetic immobilization of lipase and its application in the synthesis of structured triacylglycerols. **LWT**, v. 174, p. 114466, 15 jan. 2023.
- PRIYA, M. *et al.* Structural and electrochemical properties of ZnCo₂O₄ nanoparticles synthesized by hydrothermal method. **Vacuum**, v. 167, p. 307–312, 1 set. 2019.
- ROMERO, C. M. *et al.* Design and characterization of immobilized biocatalyst with lipase activity onto magnetic magnesium spinel nanoparticles: A novel platform for biocatalysis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 172, p. 699–707, 1 dez. 2018.
- SAUN, N. K. *et al.* Comparative study of free and immobilized lipase from *Bacillus aerius* and its application in synthesis of ethyl ferulate. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 9, p. 911–919, 2014.
- SEBATINI, A. M. *et al.* Immobilized lipase catalyzing glucose stearate synthesis and their surfactant properties analysis. **3 Biotech**, v. 6, n. 2, 1 dez. 2016.
- SINGH, N.; DHANYA, B. S.; VERMA, M. L. Nano-immobilized biocatalysts and their potential biotechnological applications in bioenergy production. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 3, p. 808–824, 1 jan. 2020.

SOWAN, E. *et al.* ZIF-8 as support for enhanced stability of immobilized lipase used with a thermoresponsive switchable solvent to simplify the microalgae-to-biodiesel process. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 167, 1 jun. 2023.

SRINATHA, N. *et al.* A novel combustion fuel for the synthesis of nanocrystalline $ZnAl_2O_4$ particles based on the thermodynamic correlations and their structural and optical studies. **Ceramics International**, v. 48, n. 3, p. 3669–3675, 1 fev. 2022.

TAN, Z. *et al.* Nanomaterial-immobilized lipases for sustainable recovery of biodiesel – A review. **Fuel**, v. 316, 15 maio 2022.

TANG, D. Y. Y. *et al.* Investigation and Screening of Mixed Microalgae Species for Lipase Production and Recovery using Liquid Biphasic Flotation Approach. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 142, 1 jan. 2023.

VOGEL, H.J. A convenient growth medium for *Neurospora*. **Microbial Genetics Bulletin**, v. 13, p. 42-43, 1956.

WANG, Y. *et al.* Synthesis and electromagnetic properties of La-doped Ni-Zn ferrites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 398, p. 90–95, 15 jan. 2016.

WINKLER, U. K.; STUCKMANN, M. **Glycogen, Hyaluronate, and Some Other Polysaccharides Greatly Enhance the Formation of Exolipase by *Serratia marcescens***. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://journals.asm.org/journal/jb>>.

WOLSKI, E. *et al.* Partial characterization of lipases produced by a newly isolated *Penicillium sp.* in solid state and submerged fermentation: A comparative study. **LWT**, v. 42, n. 9, p. 1557–1560, 2009.

YULIZAR, Y. *et al.* Two-phase synthesis of $NiCo_2O_4$ nanoparticles using *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Oken leaf extract with superior catalytic reduction of 2,4,6-trinitrophenol. **Materials Letters**, v. 311, p. 131465, 15 mar. 2022.

ZDARTA, J. *et al.* A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, MDPI, 24 fev. 2018.

ZHANG, H. *et al.* Lipase immobilization using scalable and biocompatible lignin-based material as a carrier. **Industrial Crops and Products**, v. 193, 1 mar. 2023.

ZHAO, J. FENG *et al.* Enhanced Performance of *Rhizopus oryzae* Lipase by Reasonable Immobilization on Magnetic Nanoparticles and Its Application in Synthesis 1,3-Diacylglycerol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 188, n. 3, p. 677–689, 15 jul. 2019.

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**, Elsevier B.V., 1 jun. 2020a.

ZHONG, M. *et al.* Facile preparation of highly thermal conductive ZnAl₂O₄@Al composites as efficient supports for cobalt-based Fischer-Tropsch synthesis. **Fuel**, v. 253, p. 1499–1511, 1 out. 2019.

ZHONG, W. *et al.* Enantioselective Resolution of (R, S)-2-Phenoxy-Propionic Acid Methyl Ester by Covalent Immobilized Lipase from *Aspergillus oryzae*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 190, n. 3, p. 1049–1059, 1 mar. 2020b.