

INFLUÊNCIA DO PERCENTUAL DO AGENTE RETICULANTE NA SÍNTESE DE MATRIZ POLIMÉRICA EMPREGADA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

Assis, G. P.; Silva, V. S.; Anjos, G. F.C.; Silva M. V. C; Aguiar, L. G.; Freitas, L.

Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, SP, 12602-810, Brasil
Email: gabriellepa@usp.br

RESUMO

O estudo visou desenvolver biocatalisadores de alta performance para a síntese de ésteres emolientes por meio da imobilização da lipase de *Penicillium camembertii* (lipase G) em copolímero magnetizado. Foram testadas diferentes proporções de reticulante (15%, 30%, 45%) na síntese do copolímero para avaliar seu desempenho como suporte. Os resultados indicaram que com 15% de reticulante não houve formação adequada de esferas poliméricas. A análise morfológica revelou que o copolímero com 30% apresentava "esferas murchas", enquanto o com 45% era mais homogêneo e esférico. Os biocatalisadores constituídos por 45 e 30% de reticulante, apresentaram atividades sintéticas de aproximadamente 570 e 370 U g⁻¹, respectivamente. A síntese do oleato de hexila demonstrou que o copolímero com 45% de reticulante apresentou melhor desempenho, com conversão de 81%, enquanto o com 30% resultou em 62% de conversão. Esses achados sugerem que o copolímero com 45% de reticulante é mais adequado para imobilização da lipase G e aplicação na síntese de ésteres emolientes. Estudos adicionais estão em andamento para otimizar a composição do copolímero.

Palavras-chave: imobilização de lipase, matriz polimérica, agente reticulante.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as demandas por novas tecnologias, processos industriais ecológicos e sustentáveis fez com que fossem desenvolvidas inovações empregando métodos enzimáticos para a produção de fármacos, alimentos, cosméticos, entre outros. Estima-se que, até o de ano 2028, o mercado global de enzimas terá um crescimento de 6,5% quando comparado ao mercado de 2021 que era avaliado em cerca de US\$ 11 bilhões (PEREIRA et al., 2022; SAMPAIO et al., 2022; SHELDON; BRADY, 2022).

Processos enzimáticos que empregam lipases como biocatalisadores, enzima pertencente a classe das hidrolases, tem se tornado alternativas tecnológicas promissoras, visto que possuem uma variedade de possibilidades de aplicações, tais como, em reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e hidrólise de óleos e gorduras. Tais processos demonstram elevada eficiência, alta seletividade e especificidade e gera produtos com elevada qualidade e rendimento, quando comparado à catalisadores convencionais, (PEREIRA et al., 2022; UTAMA et al., 2019).

A maioria das enzimas em seu estado livre, solubiliza em determinados meios reacionais, possuem instabilidade térmica e dificuldade de recuperação, assim, a imobilização

dessas enzimas faz-se necessária (DA SILVA et al., 2020). A utilização desta técnica é uma alternativa para a solução desses problemas, visto que, a imobilização pode reduzir possíveis inibidores durante o processo, eleva a estabilidade térmica e operacional da enzima, além da possibilidade de recuperação e reutilização ao final do bioprocessamento, facilitando a purificação do produto (CORTEZ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019; SAMPAIO et al., 2022).

Lipases imobilizadas, quando aplicadas em reações de esterificação, produzem ésteres com diferentes propriedades. Entre esses, estão os ésteres emolientes que possuem características multifuncionais oleoquímicas, pois suas aplicabilidades estão diretamente ligadas à quantidade de carbonos presentes em sua molécula. Os ésteres emolientes possuem em sua estrutura cadeias carbônicas médias (C12 a C18), o que é necessário para a formulação de produtos de beleza e cuidados com a pele (DA SILVA et al., 2020; SANTOS, 2015).

Diferentes materiais podem ser utilizados como suporte, dependendo das propriedades requeridas, tais como, resistência mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo (BILAL et al., 2018; RODRIGUES et al., 2019). Dentre estes, os híbridos poliméricos magnetizados tem se mostrado bastante interessantes para esta aplicação, pois apresentam vantagens como elevada área superficial específica, o que possibilita maior disponibilidade para imobilizar enzimas e maior interação com o meio reacional, além da facilidade de separação do biocatalisador, devido à possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração (HAJAR; VAHABZADEH, 2016; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; SHARMA et al., 2014).

Na literatura são documentados diversos trabalhos que demonstram a obtenção de biocatalisadores a partir da utilização de copolímeros para imobilização de lipases e aplicação em reações de esterificação (BENTO et al., 2017; DA SILVA et al., 2020; RANGEL et al., 2022; ROSA et al., 2020; SILVA et al., 2020). No entanto, o uso do dimetacrilato de trietilenoglicol como agente reticulante na síntese de matrizes poliméricas para utilização como suportes de imobilização de lipases e posterior aplicação na síntese de ésteres emolientes ainda é muito pouco explorado.

Rosa et al. (2020), evidenciaram em sua pesquisa um elevado grau de hidrofobicidade e uma maior capacidade de absorção de solvente para o copolímero poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol), peculiaridades importantes para o processo de imobilização de lipases, além de uma boa interação enzima/suporte necessária para a condução de reações, evidenciando assim, elevado poder catalítico para aplicação em bioprocessos.

Neste contexto, o presente estudo avaliou a influência que a variação do percentual do agente reticulante no processo de obtenção da matriz polimérica como suporte de imobilização da lipase de *Penicillium camembertii* (lipase G) via adsorção física tem sobre a performance do biocatalisador na síntese do éster oleato de hexila.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Metodologia

2.1.1 Síntese do copolímero magnetizado

Inicialmente a magnetita foi sintetizada a partir de soluções aquosas de FeCl_2 e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, sendo modificada com ácido oléico, de acordo com a metodologia descrita por Bento et al. (2017).

A síntese do copolímero poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol) – (STY-TEGDMA-M) ocorreu pela técnica de polimerização em suspensão em um reator de 0,5 L a 70°C por 6 horas sob atmosfera inerte de nitrogênio e agitação mecânica de 310 rpm definida por Rosa (2019). A fase aquosa (0,4 L) foi composta por uma solução aquosa (1% m/m) de álcool polivinílico (agente de suspensão) em água ultra pura. A fase orgânica (50 g) foi composta por 30% de monômero, na qual foram realizadas três diferentes condições, a primeira contendo 55% de estireno e 45 % de dimetacrilato de etilenoglicol, a segunda contendo 70% de estireno e 30% do agente reticulante e a terceira com 85% de estireno e 15% do reticulante. Os outros 70% da fase orgânica, foi composta por 50% de toluol (solvente de elevada afinidade) e 50% de heptano (solvente de baixa afinidade). Além disso foi adicionado 10% (m/m) de magnetita modificada e 1% (p/p) de AIBN (iniciador).

Ao final da etapa de polimerização, as esferas poliméricas foram filtradas a vácuo e secas a 60°C por 18h para posteriormente serem separadas na faixa granulométrica de interesse (0,18 – 0,71 mm).

2.1.3 Imobilização da lipase de *Penicillium camembertii* (Lipase G)

A metodologia de imobilização empregada para a realização do presente trabalho foi a de adsorção física. O suporte magnetizado sintetizado foi embebido em heptano na proporção de 1:10 (m/v) e mantido sob agitação durante 2h. Após esse período, foi preparada uma solução 5g L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG-1500), sendo adicionado 100µL desta solução para cada grama do suporte e 0,25g da lipase G.

O sistema ficou sob agitação branda à temperatura ambiente por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h sob refrigeração de 4 °C. A recuperação do derivado imobilizado foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens constantes com heptano até a redução da umidade do biocatalisador (abaixo 10 %), medida em uma balança de umidade (MOC63u – Shimadzu), sendo a análise realizada em 3 minutos a 105°C.

2.1.4 Síntese descontínua do éster emoliente

A síntese do éster emoliente ocorreu via reação de esterificação do ácido oleico com hexanol em meio isento de solvente, empregando os diferentes biocatalisadores obtidos. A reação de esterificação foi realizada em batelada utilizando frasco de vidro fechado com capacidade de 100 mL, sendo adicionados 20 mL de substrato numa razão equimolar de ácido/álcool (1:1) e 10 % (m/v) de biocatalisador durante 48 horas, sob agitação de 150 rpm e temperatura de 45°C. Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados e tituladas para quantificação do consumo do ácido graxo presente empregando uma solução 0,04 mol L⁻¹ de KOH e fenolftaleína como indicador.

2.2. Análises

2.2.1 Caracterização dos biocatalisadores sintetizados

Os biocatalisadores sintetizados foram caracterizados morfologicamente utilizando a técnica de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) seguindo metodologia descrita por De Moraes et al. (2021). O equipamento utilizado foi o espectrômetro Perkin Elmer Frontier com sensor de refletância total atenuada universal (UATR), sendo empregado para obtenção de imagens de alta resolução e ampliação. Os espectros cobriram a faixa espectral de 400 a 4000 cm⁻¹.

2.2.2 Dosagem da atividade sintética dos biocatalisadores

A atividade catalítica enzimática dos derivados imobilizados foi quantificada pelo método de esterificação para a obtenção do oleato de etila, assim como em trabalho publicado por Pinto, Freire e Pinto (2014). A reação foi conduzida sob agitação de 180 rpm e em temperatura de 45°C, sendo coletadas alíquotas (a cada 10 minutos) de 200 µL a partir do momento inicial da reação até 60 min. À cada amostra foi adicionado 10 mL de uma solução de álcool padronizado e titulado com uma solução de KOH 0,04 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade do biocatalisador foi definida pela quantidade de

enzima necessária para o consumo de 1 μmol de ácido graxo livre por minuto nas condições de ensaio e obtido através de regressão linear.

2.2.3 Acompanhamento das reações de esterificação

A formação do éster emoliente foi acompanhada através do consumo de ácidos graxos presentes na reação de esterificação, sendo quantificado por titulação utilizando uma solução aquosa de KOH (0,04 mol L⁻¹) e fenolftaleína como indicador. Alíquotas foram coletadas e adicionadas a um erlenmeyer juntamente a 10 mL de álcool etílico padronizado, sendo o consumo do ácido graxo acompanhado pela Equação 1 e sua conversão pela Equação 2.

$$\text{Ácido Carboxílico(g/L)} = \frac{V * M * MM}{v} \quad (1)$$

Em que: V é o volume de KOH utilizado (mL), M é a concentração de KOH (mol L⁻¹), MM (g mol⁻¹) é a massa molecular do ácido carboxílico utilizado e v é o volume da alíquota coletada (mL).

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(C_i - C_t)}{C_i} * 100 \quad (2)$$

Em que: C_i é a concentração do ácido carboxílico (mmol L⁻¹) e C_t é a concentração do ácido carboxílico no tempo determinado de coleta de amostra (mmol L⁻¹).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

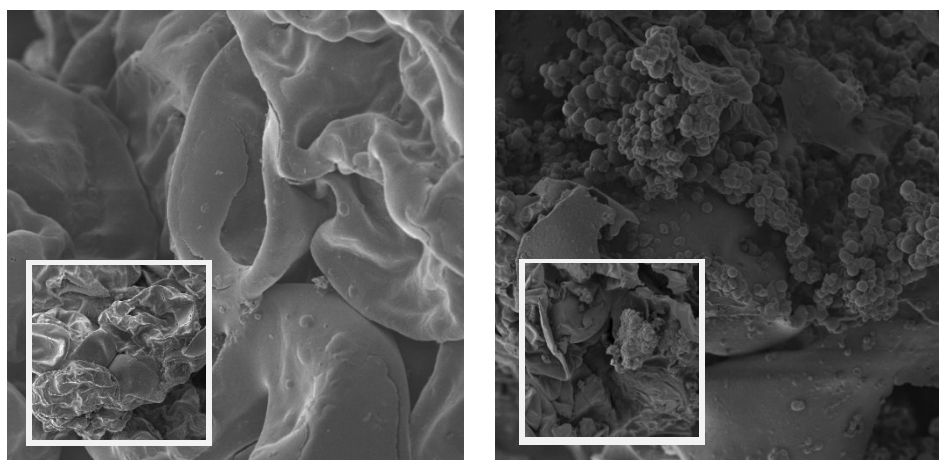
Inicialmente foram realizadas as sínteses dos copolímeros magnetizados empregando-se diferentes proporções do agente reticulante. Destaca-se que na condição experimental que empregou 15% do reticulante, não ocorreu a formação das esferas poliméricas, com isso, os resultados apresentados foram obtidos com os copolímeros contendo 30 e 45% de TEGDMA.

3.1 Caracterização dos biocatalisadores sintetizados

A Figura 1 (a) e 1 (b) ilustra as micrografias eletrônicas de varredura (MEV) dos biocatalisadores sintetizados empregando-se partículas poliméricas obtidas com 30 e 45% de TEGDMA e posteriormente imobilizadas com a lipase G.

As imagens obtidas revelaram diferenças estruturais entre os 2 derivados imobilizados, notando-se que o copolímero sintetizado com 30% de reticulante apresentava características de “esferas murchas”, enquanto que o obtido com 45% demonstrava um aspecto mais homogêneo e esférico. Além disso, foi possível observar a presença de aglomerados na estrutura dos suportes, constatando-se a menor adsorção da enzima ao copolímero com menor percentual de reticulante.

Figura 1. Micrografias dos biocatalisadores: (a) G-STY-TEGDMA-M com 30% de reticulante e com aumento de 1000 x; G-STY-TEGDMA-M com 45% de reticulante e com aumento de 1000 x.



3.2 Atividade enzimática dos biocatalisadores

A quantificação da atividade catalítica da lipase imobilizada nas duas condições avaliadas no presente estudo foi realizada por meio da síntese do oleato de etila, sendo os resultados expressos na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade enzimática dos biocatalisadores G-STY-TEGDMA-M obtidos com 30% de reticulante e G-STY-TEGDMA-M com 45% de reticulante.

Biocatalisador	Atividade de Esterificação (U g ⁻¹)
G-STY-TEGDMA-M (30% de reticulante)	278,65
G-STY-TEGDMA-M (45% de reticulante)	564,63

A Tabela 1 demonstra que ambos os derivados imobilizados apresentaram atividade enzimática, sendo que o biocatalisador que empregou 45% de reticulante apresentou resultado superior ao que utilizou 30% em sua formulação. Esses resultados revelam que a proporção de reticulante utilizada durante a polimerização, ou seja, na preparação do suporte, apresenta influência marcante no desempenho do biocatalisador sintetizado.

Silva et al. (2020) em trabalho realizado no qual empregou uma matriz polimérica similar ao presente estudo e imobilizou a lipase G, obteve atividade de 119 U g⁻¹ na esterificação do oleato de etila. Já em outro estudo, (Vilas Bôas et al. (2021), imobilizaram a lipase G em poli(estireno-divinilbenzeno), também uma matriz polimérica, e obtiveram 225 U g⁻¹ de atividade sintética, valores esses inferiores aos observados pelo presente estudo (278,65 – 564,63 U g⁻¹).

Desta forma, foi constatada a eficiência de ambos os copolímeros sintetizados como matriz para imobilização de lipase e sua aplicação na síntese de ésteres.

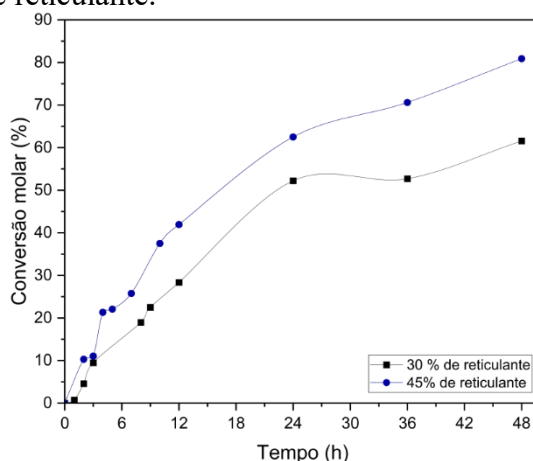
3.3 Síntese do éster emoliente oleato de hexila

A síntese do éster oleato de hexila foi realizada via esterificação direta em meio isento de solvente empregando os dois biocatalisadores sintetizados, sendo determinada a conversão do éster a partir do consumo do ácido graxo durante o período de 48 horas sob temperatura de 45°C. A Figura 2 expressa os resultados observados.

Ao analisar a Figura 2 observa-se que foram obtidas conversões de 62% para o biocatalisador obtido a partir da imobilização da lipase Gno copolímero com 30% de agente reticulante em sua formulação e 81% para o que continha 45% de TEGDMA, constatando novamente o melhor desempenho para o biocatalisador constituído com a maior porcentagem do reticulante.

Uma possível justificativa para essa diferença de conversão entre as performances dos biocatalisadores sintetizados, pode estar relacionada ao fato de que a lipase tem preferência por suportes mais polares como citado por Mendes, Oliveira e de Castro (2012).

Figura 2. Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para síntese do oleato de hexila empregando diferentes biocatalisadores (10% m/v de biocatalisador, agitação de 150 rpm e temperatura de 45°C): ■ G-STY-TEGDMA-M com 30% de reticulante; ● G-STY-TEGDMA-M com 45% de reticulante.



Rangel et al. (2022), em sua dissertação comparou o desempenho de 3 diferentes reticulantes, divinilbenzeno (DVB), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) na formulação de copolímeros magnetizados à base de estireno e observou que o reticulante TEGDMA, que apresenta log P de 1,88 (menor valor entre os testados), demonstrou característica mais hidrofílica que os demais.

Ao analisar os resultados obtidos pelo presente estudo, observa-se que o uso do copolímero contendo a maior quantidade de TEGDMA (45%), que possui vários grupamentos acrilatos em sua estrutura, e que portanto, é mais polar que o copolímero com 30% de reticulante, pode ter melhorado a interação entre enzima-suporte, e, conseqüentemente, favorecido a formação do produto, corroborando também com o maior valor de atividade sintética obtida pelo biocatalisador formado por esta matriz (564,63 U g⁻¹).

Em trabalho realizado por Silva et al. (2020), em que os autores imobilizaram a lipase G numa matriz polimérica que empregou o divinilbenzeno como agente reticulante para catalisar a síntese do palmitato de isopropila, encontraram uma conversão de 52% ao final de 48 h de reação. (Vilas Bôas et al. (2018), em trabalho publicado onde imobilizaram a lipase G em polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO₂ – HEC) visando obter o laurato de isoamila, obtiveram uma conversão de 82%. Em outro trabalho, De Lima et al. (2022), imobilizaram a lipase G em Diaion HP-20 (estireno-divinilbenzeno comercial) para a obtenção do esterato de isoamila, e encontraram 87% de conversão da reação. Analisando esses dados da literatura, constata-se, que a matriz polimérica preparada com dimetacrilato de etilenoglicol como agente reticulante, demonstra adequação para utilização como suporte de imobilização de lipase.

Baseado nos resultados obtidos, conclui-se que a variação da porcentagem do agente reticulante na etapa de polimerização para a obtenção da matriz polimérica, infere diretamente não apenas na estrutura do copolímero, mas também no seu desempenho como suporte para imobilização de lipase.

Ressalta-se que o grupo de pesquisa de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), vem estudando diferentes formulações de matrizes poliméricas magnetizadas à base de estireno, variando-se a porcentagem de diferentes agentes de reticulação, visando o aprimoramento de matrizes polimérica para aplicação como suportes de imobilização de enzimas, objetivando-se a obtenção de biocatalisadores ativos e estáveis.

4 CONCLUSÃO

Os resultados observados mostraram que o copolímero obtido com 45% de reticulante apresentou maior atividade catalítica (570 U g⁻¹) comparado ao obtido com 30% (370 U g⁻¹). A conversão máxima de ácido oleico em éster foi de 81% empregando-se o biocatalisador com 45% de reticulante, sendo a conversão máxima de 62% quando utilizou-se biocatalisador obtido com 30% de reticulante.

Estes dados indicam que a composição do copolímero influencia o desempenho catalítico dos biocatalisadores, e neste caso, a matriz polimérica mais polar favoreceu tanto o processo de imobilização da lipase, como também a síntese do éster emoliente.

Conclui-se, portanto que, o estudo e a avaliação da influência de diferentes tipos e proporções de agentes reticulantes na composição da matriz polimérica no desempenho de biocatalisadores são de extrema importância para possibilitar a implementação de bioprocessos em escala industrial.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2023/04243-7, a Universidade de São Paulo (Bolsa PUB USP) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de financiamento 001, pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIA

- BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F.; DE OLIVEIRA, P. C.; FREITAS, L. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, vol. 426, p. 95–101, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2016.11.061>.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H. M. N.; CUI, J. “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 119, p. 278–290, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.134>.
- CORTEZ, D. V.; REIS, C.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. The Realm of Lipases in Biodiesel Production. *Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy*. Springer International Publishing, 2018. p. 247–288. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95480-6_10.
- DA SILVA, M. V. C.; SOUZA, A. B.; DE CASTRO, H. F.; AGUIAR, L. G.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE FREITAS, L. Synthesis of 2-ethylhexyl oleate catalyzed by *Candida antarctica* lipase immobilized on a magnetic polymer support in continuous flow. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, vol. 43, no. 4, p. 615–623, 2020. <https://doi.org/10.1007/s00449-019-02257-9>.
- DE LIMA, R.; BENTO, H. B. S.; REIS, C. E. R.; BÔAS, R. N. V.; DE FREITAS, L.; CARVALHO, A. K. F.; DE CASTRO, H. F. Biolubricant Production from Stearic Acid and Residual Secondary Alcohols: System and Reaction Design for Lipase-Catalyzed Batch and Continuous Processes. *Catalysis Letters*, vol. 152, no. 2, p. 547–558, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10562-021-03663-z>.
- DE MORAES, N. P.; GOES, C. M.; SPERANDIO, D. C.; ROCHA, R. da S.; LANDERS, R.; PARAMASIVAM, T.; RODRIGUES, L. A. Development of a new zinc oxide/tin oxide/carbon xerogel photocatalyst for visible light photodegradation of 4-chlorophenol. *Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology*, vol. 269, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.mseb.2021.115183>.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. Biolubricant production from castor oil in a magnetically stabilized fluidized bed reactor using lipase immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles. *Industrial Crops and Products*, vol. 94, p. 544–556, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.09.030>.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 78, p. 119–134, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.03.004>.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, vol. 85–86, p. 71–92, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.08.010>.

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

PINTO, M. C. C.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. *Molecules*, vol. 19, no. 8, p. 12509–12530, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules190812509>.

RANGEL, A. B. S.; SILVA, M. V. C.; DE ASSIS, G. P.; ROSA, C. M. R.; DOS SANTOS, J. C.; DE FREITAS, L. Synthesis and Characterization of Magnetic Poly(STY-EGDMA) Particles for Application as Biocatalyst Support in Octyl Oleate Ester Synthesis: Kinetic and Thermodynamic Parameters and Mathematical Modeling. *Catalysis Letters*, 2022. <https://doi.org/10.1007/s10562-022-04234-6>.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, Á.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnology Advances*, vol. 37, no. 5, p. 746–770, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

ROSA, C. M. R.; DA SILVA, M. V. C.; DE AGUIAR, L. G.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Prediction and comparison of textural properties of magnetic copolymer supports for enzyme immobilization. *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 137, no. 41, 2020. <https://doi.org/10.1002/app.49258>.

SAMPAIO, C. S.; ANGELOTTI, J. A. F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 215, p. 434–449, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.06.139>.

SANTOS, J. S. Esterificação de ácido oleico e álcoois (C2-C8): estudos de partição de compostos e influência de catalisadores. 2015. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos) - Universidade Tiradentes, Aracajú, 2015.

SHARMA, D.; KUMBHAR, B. K.; VERMA, A. K.; TEWARI, L. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, vol. 3, no. 4, p. 205–211, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2014.04.004>.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Green Chemistry, Biocatalysis, and the Chemical Industry of the Future. *ChemSusChem*, vol. 15, no. 9, 2022. <https://doi.org/10.1002/cssc.202102628>.

SILVA, M. V. C.; AGUIAR, L. G.; ROSA, C. M. R.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Kinetic study of isopropyl palmitate synthesis catalyzed by lipases immobilized on a magnetic copolymer support. *Chemical Engineering Communications*, vol. 207, no. 9, p. 1329–1336, 2020.
<https://doi.org/10.1080/00986445.2019.1647179>.

UTAMA, Q. D.; SITANGGANG, A. B.; ADAWIYAH, D. R.; HARIYADI, P. Lipase-catalyzed interesterification for the synthesis of medium-long-medium (MLM) structured lipids - A review. *Food Technology and Biotechnology*, vol. 57, no. 3, p. 305–318, 2019.
<https://doi.org/10.17113/ftb.57.03.19.6025>.

VILAS BÔAS, R. N.; CERON, A. A.; BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. *Biomass and Bioenergy*, vol. 119, p. 61–68, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2018.09.011>.

VILAS BÔAS, R. N.; LIMA, R. de; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; BENTO, H. B. S.; CARVALHO, A. K. F. de; DE CASTRO, H. F. Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: Lipase screening, reactor system development, and reaction optimization. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, vol. 168, 2021.
<https://doi.org/10.1016/j.cep.2021.108568>.

TITLE

INFLUENCE OF CROSSLINKING AGENT PERCENTAGE ON THE SYNTHESIS OF POLYMER MATRIX USED AS A SUPPORT FOR LIPASE IMMOBILIZATION

ABSTRACT

The study aimed to develop high-performance biocatalysts for the emollient esters synthesis through the immobilization of *Penicillium camembertii* lipase (lipase G) on a magnetized copolymer. Different crosslinker proportions (15%, 30%, 45%) were tested in the synthesis of the copolymer to evaluate its performance as a support. The results indicated that with 15% of crosslinking agent, there was no proper formation of polymeric spheres. Morphological analysis revealed that the copolymer with 30% of crosslinking agent exhibited "withered spheres," while the one with 45% was more homogeneous and spherical. The biocatalysts composed of 45% and 30% of crosslinking agent showed synthetic activities of approximately 570 and 370 U g⁻¹, respectively. The synthesis of hexyl oleate showed that the copolymer with 45% of crosslinking agent exhibited better performance, with a conversion of 81%, while the one with 30% resulted in a 62% conversion. These findings suggest that the copolymer with 45% of crosslinking agent is more suitable for the immobilization of lipase G and its application in the synthesis of the emollient esters. Further studies are in progress to optimize the copolymer composition.

Keywords

Lipase Immobilization, Polymer Matrix, Crosslinking Agent