UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

RENATA DE NAZARÉ VILAS BÔAS

**Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades
aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação
utilizando lipases imobilizadas**

Lorena

2018

RENATA DE NAZARÉ VILAS BÔAS

Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas,
emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Prof. Dra. Heizir Ferreira de Castro

Versão Original

Lorena

2018

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Vilas Bôas, Renata de Nazaré

Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas / Renata de Nazaré Vilas Bôas; orientador Heizir Ferreira de Castro - Versão Original. - Lorena, 2018.
235 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2018

1. Ésteres. 2. Esterificação. 3. Lipase imobilizada. 4. Óleo fúsel. 5. Processo contínuo. I. Título. II. de Castro, Heizir Ferreira, orient.

Dedicatória

A Deus que me dotou de razão, inteligência e vontade, caracteres peculiares de sua natureza imortal.

Ao meu querido Anjo da Guarda, meu zeloso protetor, por me guiar e orientar a minha inspiração na conclusão em mais esta etapa.

A minha querida Mãe Hélia pelo carinho, apoio incondicional e presença constante em mais esta etapa. Mãe é com você com quem divido a conquista deste título!!!

Aos meus queridos Avôs Nita e João José que mesmo como anjos sempre estiveram presentes em meu coração.

Aos meus queridos irmãos, eternos companheiros, Regiane, Regilane, Reginaldo e Regina. A Regiane por sempre me incentivar aos estudos desde os meus primeiros dias de aula, a Regilane pelo apoio e orientações nos momentos difíceis de saúde e a Regina minha amiga inseparável.

Aos meus queridos sobrinhos Alissa, Mateus, Guilherme, Diogo e Davi. Que vocês um dia também sejam despertados pelo conhecimento como eu fui.

Ao meu Pai Sebastião Batista, que sempre transmitiu a honestidade, a força e a importância de se aprender a trabalhar. Elementos fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A presença de vocês foi fundamental para a conclusão deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Profa. Dra. Heizir Ferreira de Castro, pela oportunidade concedida de desenvolver este trabalho, pela competência em orientar, pelos seus valiosos ensinamentos, dedicação em todos os momentos, apoio constante durante a realização deste trabalho e por ser um exemplo de profissionalismo.

Ao Prof. Dr. Francisco Carlos Biaggio pelo apoio na realização de parte deste trabalho, além das valiosas sugestões e contribuições neste trabalho.

A Profa. Dra. Jayne Carlos de Souza Barboza pela realização das análises de RMN e por sempre ter se colocado disponível a ajudar.

Ao Prof. Dr. Domingos Sávio Giordani por ter disponibilizado o uso do equipamento Nariz eletrônico para análises. Análises que contribuíram muito para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes e a Profa. Dra. Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues pelas valiosas sugestões e contribuições neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Carlos de Oliveira, Profa. Dra. Patrícia Molgero Da Rós e a Profa. Dra. Larissa de Freitas pela orientação nos estágios de docência do PAE e por sempre ter-se colocado à disposição em ajudar.

Aos Pós-Graduandos e Doutores do Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena: Ana Karine Furtado, Ana Teixeira, Annie Ceron, Carolina Azevedo, Cristiano Reis, Cintia Rosa, Daniela Cortez, Heitor Buzetti, Mateus Casagrande, Mayara Rocha, Lucas Ramos, Lucas Martin, Rodney Miotti, Savienne Erbrock e Weriton Fidalgo, por sempre ter-se colocado à disposição em ajudar, pela amizade e convivência nesse período. Em especial as Doutoradas do Laboratório, Ana Karine e Daniela por sempre cuidar do laboratório e se colocarem a disposição em ajudar.

Aos ICs do laboratório: Martim, Pedro, Homero, Túlio, Tarsila, Caio, Giovana, Tiago e Felipe pela amizade e pela disposição em ajudar.

A minha querida Tia Cida por sempre ter me colocado em suas orações.

Ao meu cunhado Prof. Dr. Jackson Antônio Barbosa por ter sempre se colocado à disposição em ajudar desde a minha primeira matrícula na Universidade.

Ao amigo Erlon Lopes pela amizade e por ter me apresentado a USP de Lorena. E a amiga Larissa Duarte pela amizade, encontros nos finais de semana em Lorena e por ter me recebido em sua casa em São José dos Campos e Campinas.

Aos professores que ministraram as disciplinas da pós-graduação, Prof. Arnaldo Márcio, Prof. Júlio, Prof. Pedro e Profa. Rita, pelos ensinamentos e oportunidades dos trabalhos desenvolvidos.

Ao Departamento de Biotecnologia e ao Departamento de Engenharia Química da Escola de Engenharia de Lorena pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

A CAPES pela concessão da bolsa de estudo.

Ao ensino público gratuito e de qualidade, por ter me concedido a oportunidade de realizar Graduação, Mestrado e Doutorado.

RESUMO

VILAS BÔAS, R. N. **Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas.** 2018. 235 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2018.

O presente trabalho teve como objetivo o aproveitamento da matéria-prima residual óleo fúsel como fonte de baixo custo de álcool isoamílico para a síntese de ésteres com diferentes propriedades pela rota enzimática. Utilizou-se como proposta a esterificação do óleo fúsel com ácidos carboxílicos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica mediada pela enzima lipase em processos descontínuo ou contínuo, visando obter produtos com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes. A lipase selecionada de *Rhizopus oryzae* foi posteriormente imobilizada em diferentes suportes sílica- β -ciclodextrina (SiO_2 - β CD), sílica-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) ou co-polímero de estireno de divinilbenzeno (STY-DVB) e utilizada como biocatalisador para mediar as reações de esterificação do óleo fúsel com os ácidos caprílico, láurico e oleico. Entre os suportes testados, apenas a sílica-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) apresentou resultados insatisfatórios em função da elevada afinidade desta matriz em adsorver a água formada como subproduto na reação de esterificação. Para cada par de óleo fúsel e ácido carboxílico, as condições adequadas para obtenção dos produtos alvos foram estabelecidas e os produtos resultantes analisados de acordo com a finalidade proposta. No caso do caprilato de isoamila, as condições reacionais foram determinadas por planejamento experimental, indicando que a formação do éster foi influenciada somente pela variável razão molar ao nível de 95% de confiança. O modelo matemático proposto permitiu prever as condições que favorecem o alcance de elevados rendimentos de formação do éster, sendo a reação maximizada (82% em 24 h) para meios reacionais constituídos de óleo fúsel e ácido caprílico na razão molar de 1:1,5 e temperatura de 45 °C. O perfil sensorial do éster foi confirmado com auxílio do nariz eletrônico. Com relação ao laurato de isoamila foi possível estabelecer o processo em regime contínuo utilizando a lipase de *R. oryzae* imobilizada em STY-DVB operando o sistema com concentrações elevadas do substrato que forneceu produtividades elevadas ($1598,68 \pm 135,79 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) do éster com excelente capacidade de dispersão de pigmentos que pode ser utilizado na formulação de cosméticos com rotulagem de produto natural. Finalmente, com relação ao éster oleato de isoamila, foi constatado limitado desempenho da lipase *R. oryzae* imobilizada em STY-DVB devido baixa atividade sintética deste biocatalisador para ácidos carboxílicos insaturados. Mesmo assim, foi possível obter produtividades volumétricas da ordem de $286,20 \pm 18,46 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, utilizando uma configuração de reator de leito empacotado em dois estágios acoplado a uma coluna extratora de água. As propriedades do produto formado atenderam as especificações recomendadas para uso como biolubrificante. Desta forma, o presente projeto de tese demonstrou a potencialidade da aplicação do óleo fúsel como fonte de baixo custo do álcool isoamílico na obtenção ésteres com propriedades adequadas para uso como aroma, emulsificante e lubrificante. O aproveitamento deste resíduo não somente retira um composto indesejado do meio ambiente, mas também permite a geração de diferentes produtos de interesse industrial, constituindo-se, assim, em um forte apelo ambiental.

Palavras-chave: Ésteres. Esterificação. Lipase imobilizada. Óleo fúsel. Processo contínuo.

ABSTRACT

VILAS BÔAS, R. N. **Fusel oil as a precursor in the synthesis of esters with aromatic, emulsifying and lubricant properties by biotransformation using immobilized lipase.** 2018. 235 p. Thesis (Doctor of Science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2018.

The aim of the present work was to investigate the feasibility of using fusel oil as a source of low cost feedstock based on isoamyl alcohol for the synthesis of esters with different properties by enzymatic route. For this, it was proposed to perform the esterification reaction of fusel oil with carboxylic acids with different sizes of carbonic chain mediated by the enzyme lipase under batch or continuous runs, in order to obtain products with aromatic, emulsifying and lubricant properties. *Rhizopus oryzae* lipase immobilized on different supports silica- β -cyclodextrin (SiO_2 - β CD), silica-hydroxyethylcellulose (SiO_2 -HEC) or co-polymer of styrene divinylbenzene (STY-DVB) were chosen as biocatalysts to mediate the esterification reactions of fusel oil with caprylic, lauric and oleic acids. Among the supports tested, only the silica hydroxyethylcellulose (SiO_2 -HEC) provided unsatisfactory results due to its high affinity to adsorb the water generated as byproduct. For each pair of fusel oil and carboxylic acid, appropriate conditions for obtaining the target product were established, and the resulting product further analyzed according to its proposed use. In the case of isoamyl caprylate, reaction conditions were determined by factorial design, indicating that the ester formation was influenced only by the molar ratio at 95% of confidence level. The proposed mathematical model allowed predicting the conditions that favor the achievement of high yields of ester formation, being maximized (82% in 24 h) with substrate consisting of fusel oil and caprylic acid at molar ratio of 1:1.5 and temperature of 45°C. The sensory profile of the ester was confirmed with help of the electronic nose. With respect to isoamyl laurate it was possible to establish a stable process under continuous flow using *R. oryzae* lipase immobilized on STY-DVB feeding the reactor with high substrate concentrations, providing high ester productivity ($1598.68 \pm 135.79 \text{ g}^{-1} \mu\text{mol min}^{-1}$) with excellent dispensability of pigments that can be used in cosmetic formulation label as natural product. Finally, with regards to the isoamyl oleate, the performance of *R. oryzae* lipase immobilized on STY-DVB was limited due to its low activity towards unsaturated carboxylic acids. Still, it was possible to obtain volumetric productivity of about $286.20 \pm 18.46 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ using two-stage packed bed reactor coupled with a water column extraction. The properties of the formed product meet the specifications recommend for use as biolubricant. In this way, this work demonstrated the feasibility of applying the fusel oil as a source of low-cost isoamyl alcohol to obtain esters with appropriate properties for use as flavor, emulsifier or lubricant. The use of this waste material not only removes unwanted compounds from the environment, but also allows the generation of different products of industrial interest, thus having a strong environmental appeal.

Keywords: Esters. Esterification. Immobilized lipase. Fusel oil. Continuous process.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Vantagens das reações catalisadas por lipases em meio orgânico, incluem ampla variedade de reações químicas que não são viáveis em soluções aquosas e também outras aplicações.	37
Figura 2.2 - Esquema geral da reação de hidrólise de triacilgliceróis por uma lipase 1,3 específica. As letras G, MG, DG e TG representam o glicerol, monoacilgliceróis, diacilgliceróis e triacilgliceróis, respectivamente.	40
Figura 2.3 - Esquema da alcoólise de uma mistura racêmica de butirato de citronila.	41
Figura 2.4 - Mecanismo catalítico de lipases baseado na “triade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e aspartato ou glutamato.	43
Figura 2.5 - Reações catalisadas pelas lipases.	44
Figura 2.6 - Esquema da síntese de ésteres por esterificação e transesterificação.	48
Figura 2.7 - Exemplos de configurações de biorreatores utilizados na bioconversão de processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reatores (a) leito fixo (PBR - Packed bed reactor), (b) leito fluidizado (FBR - Fluidized bed reactor), (c) batelada tanque agitado (BSTR - Batch stirred tank reactor), (d) contínuo tanque agitado (CSTR - Continuous stirred-tank reactor) e (e) Reator de Membrana (MR - Membrane Reactor).	60
Figura 2.8 – Esquema da síntese de ésteres por catálise enzimática a partir da matéria-prima residual óleo fúsel com ácidos carboxílicos de diferentes tamanhos de cadeia.	66
Figura 3.1 - Fluxograma referente ao procedimento experimental adotado nas sínteses dos padrões cromatográficos.	83
Figura 3.2 – Esquema da reação de esterificação do álcool isoamílico com ácido carboxílico.	85
Figura 3.3 - Esquema experimental das reações em reator de leito fixo de um estágio operando em regime contínuo.	88
Figura 3.4 – Esquema experimental da reação de esterificação em 2 colunas em série operando em regime contínuo, empregando coluna extratora de umidade.	89
Figura 3.5 – Nariz eletrônico (Modelo - Cyranose 320TM).	95
Figura 4.1 - Conversão molar do álcool isoamílico durante a síntese do caprilato de isoamila mediada por diferentes fontes de lipases imobilizadas em SiO ₂ -βCD nos tempos de reações 12, 24 e 48 h (condições: temperatura = 45 °C, razão equimolar álcool/ácido e meio isento de solvente).	103
Figura 4.2 - Superfície de resposta de acordo com a equação predita para conversão molar do álcool isoamílico (%) em função da razão molar álcool/ácido e temperatura.	107
Figura 4.3 - Perfil de consumo do isobutanol (■) e álcool isoamílico (●) na formação dos ésteres caprilato de isobutila (□) e caprilato de isoamila (○) na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico nas condições estimadas pelo planejamento fatorial (razão molar (álcool/ácido) de 1:5 e temperatura de 45 °C).	108
Figura 4.4 - Perfil de aromas dos materiais de partida e produtos obtidos na esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel.	110

Figura 5.1 – Perfil do consumo do álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação do éster (○) durante o progresso da reação de esterificação do álcool isoamílico com ácido láurico catalisada por lipases imobilizadas em SiO ₂ -HEC: (a) <i>Candida rugosa</i> , (b) <i>Pseudomonas fluorescences</i> , (c) <i>Burkholderia cepacia</i> , (d) <i>Rhizopus oryzae</i> , (e) <i>Penicillium camemberti</i> .	119
Figura 5.2 - Perfil do consumo de álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação de laurato de isoamila (○) na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido láurico em processo descontínuo (razão molar de álcool e ácido de 1:1.5 e temperatura de 45 °C).	121
Figura 5.3 – Perfil de consumo de álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação de laurato de isoamila (○) na esterificação do óleo fúsel com ácido láurico usando lipase imobilizada em SiO ₂ -HEC em fluxo contínuo.	122
Figura 5.4 – Perfil de consumação de álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação de laurato de isoamila (○) usando lipase imobilizada em resina HP 20 Diaion.	124
Figura 5.5 – Monitoramento do teor de água (%) na fase líquida como função de tempo na performace da síntese de laurato de isoamila em reator de leito fixo carregado com <i>R. oryzae</i> imobilizada em diferentes suportes (▽) SiO ₂ -HEC e (▲) resina HP 20 Diaion.	125
Figura 5.6 - Formação de laurato de isoamila em reator de leito fixo carregado com <i>R. oryzae</i> imobilizada em resina HP 20 Diaion alimentado com substrato em alta concentração (0,8 mol L ⁻¹) de álcool isoamílico.	126
Figura 6.1 – Perfil de consumo do álcool isoamílico (○) e ácido oleico (□) na formação do oleato de isoamila (●) na reação de esterificação enzimática do óleo fúsel com ácido oleico em processo descontínuo (razão molar de álcool e ácido de 1:1,5 e temperatura de 45 °C) na presença de solvente.	135
Figura 6.2 – Perfil da formação do oleato de isoamila na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico por lipase imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (reação controle, tempo espacial= 7,4 h; carga de biocatalisador =2.6 g; razão molar de álcool e ácido de 1:1,5 e temperatura de 45 °C na presença de solvente).	136
Figure 6.3 - Montagem experimental utilizada na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico em reatores de leito fixo dois estágios conectado com coluna extratora de água: 1 banho para controle de temperatura; 2 reservatório de alimentação; 3 bomba peristáltica; 4, 6 colunas empacotadas com lipase imobilizada; 5 coluna empacotada com peneiras moleculares; 7 reservatório do produto; 8 (linha pontilhada) água corrente; 9 (linha contínua), corrente de alimentação.	137
Figura 6.4 - Teor de água no reator de leito fixo de dois estágios antes (coluna branca) e depois (coluna cinzenta) do extrator de coluna de água.	138
Figure 6.5 - Perfil de formação do oleato de isoamila antes (●) e depois (○) do extrator da coluna de água na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico em PBR de dois estágios (tempo espacial = 10,2 h; carga de biocatalisador = 5,2 g; razão molar de 1:1,5 e temperatura de 45 °C na presença de solvente).	139
Figura 6.6 - Modelo cinético de inativação adaptado aos pontos experimentais da atividade catalítica de reação de controle- PBR um estágio (■), PBR em série com extrator de coluna de água (□), durante a esterificação contínua a 45 °C.	140
Figure 6.7 - Espectros de FTIR de amostras de óleo fusel, ácido oleico e oleato de isoamila.	141

Figure 6.8 – Espectros de RMN C^{13} e RMN H^1 em amostras purificadas de oleato de isoamila.....	142
Figura C.1 - Espectros de RMN H^1 ($CDCl_3$, δ , ppm, 300Hz) do padrão caprilato de butila.....	158
Figura C.2 - Espectros de RMN H^1 ($CDCl_3$, δ , ppm, 300Hz) do padrão caprilato de isoamila.....	158
Figura C.3 - Espectros de RMN H^1 ($CDCl_3$, δ , ppm, 300Hz) do padrão laurato de isoamila.....	159
Figura C.4 - Espectros de RMN H^1 ($CDCl_3$, δ , ppm, 300Hz) do padrão oleato de isoamila.....	159
Figura D.1 - Cromatograma típico gerado na quantificação dos álcoois (butanol e isoamílico) e ésteres (caprilato de butila e caprilato de isoamila) empregando o método estabelecido.....	162
Figura D.2 - Cromatograma típico gerado na quantificação do álcool isoamílico e éster laurato de isoamila empregando o método estabelecido.	162
Figura D.3 - Cromatograma típico gerado na quantificação do álcool isoamílico e éster oleato de isoamila empregando o método estabelecido.....	163
Figura E.1 - Progresso da formação do estearato de etila e oleato de etila em reações catalisadas por <i>R. oryzae</i> imobilizada em STY-DVB.....	165

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Exemplos de lipases disponíveis comercialmente.	38
Quadro 2.2 - Aplicações de lipases conforme tipo de reação catalisada.	45
Quadro 3.1 - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação dos ésteres caprilato e laurato de isoamila.	93
Quadro 3.2 - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação do éster oleato de isoamila.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Propriedades bioquímicas de algumas lipases microbianas de acordo com os fabricantes.	39
Tabela 2.2 - Visão geral de síntese de ésteres sintetizados por catálise enzimática.	49
Tabela 2.3 - Log P de alguns solventes orgânicos.	54
Tabela 2.4 – Visão geral de síntese de ésteres sintetizados por catálise enzimática em processo contínuo.	63
Tabela 2.5 - Rendimento de éster relatado por vários autores obtidos pela esterificação do álcool isopentanol proveniente do óleo fúsel com diferentes ácidos carboxílicos com diversas enzimas na presença ou ausência de solventes.	65
Tabela 3.1 - Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para os suportes de SiO ₂ -βCD, SiO ₂ -HEC e Diaion HP-20.	81
Tabela 3.2 - Álcoois, razões molares e biocatalisadores testados nas reações de síntese de ésteres de ácidos carboxílicos em regime descontínuo.	86
Tabela 3.3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2 ² com face centrada.	87
Tabela 3.4 - Condições operacionais testadas em regime contínuo.	90
Tabela 4.1 - Atividade enzimática (U g ⁻¹) e teor de umidade das preparações de lipases imobilizadas em SiO ₂ -βCD.	102
Tabela 4.2 - Matriz experimental e resultados obtidos no planejamento composto de face centrada 2 ² utilizado para determinar as condições otimizadas da reação de esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel catalisada pela lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -βCD.	104
Tabela 4.3 - Estimativa dos efeitos para a conversão molar do álcool isoamílico de acordo com o planejamento fatorial 2 ² com face centrada para um nível de confiança 95%.	105
Tabela 4.4 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta conversão molar (%).	106
Tabela 4.5 - Rendimento de éster relatado por vários autores e pelo presente trabalho, obtidos pela esterificação do álcool isoamílico proveniente do óleo fúsel com ácido carboxílico com diversas enzimas e sob diferentes tempos de reação.	108
Tabela 5.1 – Atividade enzimática (U g ⁻¹) e umidade das lipases imobilizadas em SiO ₂ -HEC.	118
Tabela 5.2 - Esterificação do álcool isoamílico com ácido láurico catalisada por diferentes fontes de lipases.	120
Tabela 5.3 - Comparação do desempenho da lipase <i>R. oryzae</i> imobilizada em diferentes suportes na esterificação do óleo fúsel com ácido láurico conduzida em reator de leito fixo em fluxo contínuo, com razão molar de óleo fúsel e ácido (1:1,5) na presença de iso-octano em 45 °C.	124
Tabela 5.4 – Produção de ésteres de laurato em processo contínuo usando diferentes álcoois em comparação com resultados obtidos no presente estudo.	127

Tabela 6.1 - Estabilidade operacional da lipase <i>R. oryzae</i> imobilizada em STY-DVB sob reações contínuas de esterificação realizadas em um PBR.....	140
Tabela A.1 - Atividade enzimática (U g^{-1}) das lipases livres.	156
Tabela D. 1 - Condições de operação do cromatógrafo para o método de dosagem de consumo de álcoois e formação de caprilato de butila e caprilato de isoamila.	160
Tabela D. 2 - Condições de operação do cromatógrafo para o método de dosagem de consumo de álcoois e formação de laurato de isoamila.....	161
Tabela D.3 - Condições de operação do cromatógrafo para o método de dosagem de consumo de álcoois e formação de oleato de isoamila.	161
Tabela D.4 - Avaliação estatística da recuperação e da reprodutibilidade dos métodos cromatográficos.	163
Tabela E.1 - Comparação das atividades de esterificação da lipase <i>R. oryzae</i> imobilizada em STTY-DVB em diferentes modelos de reação.	165

LISTA DE ABREVIACÕES

IV	Índice de viscosidade
kd	Constante de desativação
PBR	Reatores de leito fixo (Plug bed reactor)
RM	Razão molar
SiO₂-βCD	Polissiloxano-β-ciclodextrina
SiO₂-HEC	Polissiloxano-Hidroxietylcelulose
t_m	Tempo médio de residência
t_{1/2}	Tempo de meia-vida
τ	Tempo espacial

SUMÁRIO

Motivação do Tema do Projeto de Tese.....	25
1.1 INTRODUÇÃO	27
1.2 TRABALHOS ANTERIORES DESENVOLVIDOS	28
1.3 OBJETIVOS	29
1.4 ESTRUTURA DA TESE.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
Revisão Bibliográfica	33
2.1 Processos enzimáticos em meio orgânico.....	35
2.2 Lipases	37
2.2.1 Fontes.....	37
2.2.2 Propriedades.....	38
2.2.3 Especificidade e regiosseletividade	39
2.2.4 Estrutura e mecanismo de ação das lipases	41
2.2.5 Reações catalisadas pelas lipases.....	44
2.2.6 Aplicações potenciais das lipases	45
2.2.7 Uso de lipases imobilizadas.....	46
2.3 Síntese de ésteres por lipases	47
2.4 Fatores que interferem na síntese de ésteres catalisada por lipases	52
2.4.1 Influência do solvente	53
2.4.2 Influência do teor de água.....	55
2.4.3 Influência do suporte de imobilização	57
2.4.4 Estratégias para a remoção de água de sistemas reacionais.....	58
2.5 Reatores enzimáticos	59
2.5.1 Reatores de leito fixo	61
2.6 Utilização do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres.....	64
2.7 Síntese enzimática de ésteres a partir de óleo fúsel com diferentes ácidos carboxílicos.....	66
2.7.1 Caprilato de isoamila	67
2.7.2 Laurato de isoamila.....	68
2.7.3 Oleato de isoamila	68
REFERÊNCIAS.....	70
Metodologia Experimental.....	79
3.1 Materiais	81
3.1.1 Lipases	81
3.1.2 Suporte de imobilização.....	81
3.1.3 Materiais de partida	82
3.1.4 Outros reagentes	82
3.2 Equipamentos.....	82
3.3 Metodologia experimental	83
3.3.1 Síntese química dos padrões cromatográficos (caprilato de butila, caprilato de isoamila, laurato de isoamila e oleato de isoamila) empregando SOCl ₂	83
3.3.2 Tratamento do óleo fúsel	84
3.3.3 Imobilização das lipases nos suportes híbridos	84
3.3.4 Imobilização da lipase no suporte polimérico	85
3.3.5 Síntese dos ésteres em regime descontínuo	85
3.3.6 Delineamento experimental	87
3.3.7 Síntese de ésteres em regime contínuo	87
3.3.8 Purificação dos ésteres de isoamila	90

3.4 Métodos de análise.....	90
3.4.1 Densidade das enzimas imobilizadas.....	90
3.4.2 Teor de umidade das enzimas imobilizadas	91
3.4.3 Determinação da atividade hidrolítica das lipases	91
3.4.4 Determinação da atividade de esterificação.....	91
3.4.5 Determinação de ácidos carboxílicos	92
3.4.6 Caracterização dos ésteres por RMN H^1	92
3.4.7 Caracterização dos ésteres por FT-IR.....	92
3.4.8 Propriedades dos ésteres purificados	92
3.4.9 Determinação dos produtos formados e álcool consumido	93
3.4.10 Identificação de aromas por nariz eletrônico	94
3.5 Cálculos	95
3.5.1 Tempo espacial (τ).....	95
3.5.2 Produtividade	96
3.5.3 Tempo de meia-vida da enzima imobilizada	96
REFERÊNCIAS.....	98
Esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico	99
4.1 INTRODUÇÃO	101
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
4.2.1 Seleção da lipase para síntese do caprilato de isoamila.....	102
4.2.2 Otimização da síntese do caprilato de isoamila	103
4.2.3 Avaliação sensorial dos ésteres formados durante as reações de esterificação	110
4.3 CONCLUSÃO	111
REFERÊNCIAS.....	112
Esterificação do óleo fúsel com ácido láurico	115
5.1 INTRODUÇÃO	117
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	118
5.2.1 Seleção de lipases para a síntese de laurato de isoamila.....	118
5.2.2 Esterificação enzimática de laurato de isoamila utilizando óleo fúsel	120
5.2.3 Síntese do laurato de isoamila em processo contínuo.....	121
5.3 CONCLUSÃO	128
REFERÊNCIAS.....	129
Esterificação do óleo fúsel com ácido oleico	131
6.1 INTRODUÇÃO	133
6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	134
6.2.1 Síntese de biolubrificante em modo descontínuo	134
6.2.2 Síntese de biolubrificante em modo contínuo.....	135
6.2.3 Estabilidade operacional do biocatalisador.....	139
6.2.4 Propriedades do éster	141
6.3 CONCLUSÃO	143
REFERÊNCIAS.....	144
Conclusões e Recomendações para Trabalhos Futuros	145
7 CONCLUSÕES	147
RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	151
APÊNDICES	153
APÊNDICE A – Características e atividade hidrolítica das enzimas livres	155
APÊNDICE B – Certificado de análise do óleo fúsel	157

APÊNDICE C - Caracterização dos padrões cromatográficos (caprilato de butila, caprilato de isoamila, laurato de isoamila e oleato de isoamila) por RMN H^1	158
APÊNDICE D - Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem do consumo de álcool e formação de ésteres	160
APÊNDICE E - Especificidade da lipase de <i>Rhizopus oryzae</i> com relação a ácidos carboxílicos de cadeia longa saturados e insaturados em meio não aquoso	164
ANEXOS.....	167

CAPÍTULO 1

MOTIVAÇÃO DO TEMA DO PROJETO DE TESE

1.1 INTRODUÇÃO

Entre os subprodutos gerados pela Indústria Sucroalcooleira, o óleo fúsel apresenta grande potencial de reaproveitamento devido sua composição rica em alcoóis superiores e elevado volume gerado (120 milhões de litros/ ano). Alcoóis superiores são constituídos por mais de dois átomos de carbono como isoamílico, isobutilico, isopropílico, propílico, butílico (PATIL et al., 2002). Óleo fúsel é de cor marrom escuro e tem odor muito desagradável, o que limita sua utilização direta como um solvente (CALAM et al., 2015; MAYER et al., 2015) embora alguns autores indiquem sua adição ao biodiesel e gasolina para melhorar o índice de cetano. Possíveis alternativas para o aproveitamento deste resíduo incluem queima em caldeiras para criar vapor (XIONG et al., 2008) ou como precursores em reações de esterificação, resultando numa variedade de ésteres dependendo o doador de acila, tais como ácido acético (KIRDI et al., 2017); ácido butírico (ANSCHAU et al., 2011); ácido octanóico (CASTRO; MORIYA, RIBEIRO, 2000); ácido láurico (CASTRO et al., 1999) e ácido oleico (DORMO et al., 2004).

Os ésteres pertencem a uma classe de compostos orgânicos de grande importância industrial, nos quais os ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia curta, média e longa (4 - 18 átomos de carbonos) tem função destacada como componentes de aromas, emolientes e biolubrificantes (KHAN; RATHOD, 2015; SALIMON et al., 2014; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Embora a síntese de ésteres possa ser conduzida por via química, há desvantagens associadas ao custo energético, como o uso de condições operacionais elevadas de temperatura e pressão (KÜÇÜK, CEYLAN, 1989). Além disso, catalisadores químicos possuem baixa especificidade, fornecendo geralmente produtos de composição química mista ou contaminada, o que requer etapas posteriores de purificação (BI et al., 2008).

Desta forma, a síntese enzimática tem se mostrado uma alternativa importante para substituição gradativa dos processos químicos tradicionais por oferecer vantagens necessárias ao estabelecimento de um processo tecnologicamente limpo (CHOI; HAN; KIM, 2015; FELIPE et al., 2017), sendo cada vez mais crescente o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica (BIROLI et al., 2015). Entre esses, especial atenção tem sido dedicada à enzima lipase (glicerol éster hidrolases – EC 3.1.1.3), em função de sua versatilidade catalisando uma diversidade de reações com extrema facilidade, obtendo produtos de qualidade com elevado rendimento (STERGIOU et al., 2013; CHOI; HAN; KIM, 2015).

De maneira geral, as lipases não requerem cofatores, atuam em ampla faixa de pH, são estáveis a altas temperaturas e possuem elevada especificidade e enantiosseletividade e são compatíveis com diversos substratos. As lipases podem catalisar ésteres por diferentes rotas como esterificação direta de álcool com ácido carboxílico, pela troca do componente alcoólico com um éster (alcoolise) ou troca entre os radicais ésteres entre dois ésteres (transesterificação) (STERGIOU et al., 2013; FELIPE et al., 2017).

A síntese catalisada por lipases de mais de 50 ésteres já foi descrita na literatura (DHAKE; THAKE; BHANAGE, 2013; KHAN; RATHOD, 2015), e em princípio, a reação pode ser conduzida a partir de um álcool com ácido carboxílico em presença ou ausência de solventes, resultando em produtividades elevadas e rendimentos quantitativos (STERGIOU et al., 2013). Entretanto, os trabalhos reportados na literatura referentes a aplicação das lipases na esterificação direta dos alcoóis presentes no óleo fúsel em seus ésteres carboxílicos respectivos, ainda são reduzidos (MACEDO; PASTORE, 1997; CASTRO et al., 1999; WELSH; WILLIAMS, 1989), provavelmente em função das dificuldades técnicas envolvidas quando misturas naturais de alcoóis são usadas em reações de esterificação, como por exemplo, a competição entre dois ou mais nucleofílicos pelo mesmo sítio ativo da enzima e o elevado teor de água presente nesse material (CASTRO; MORIYA, RIBEIRO, 2000). Além disso, a presença de teores elevados de alcoóis secundários pode acarretar uma complexidade adicional, tendo em vista que a esterificação de alcoóis secundários é fortemente dependente da especificidade da lipase e do tamanho da cadeia do ácido carboxílico (CASTRO; MORIYA, RIBEIRO, 2000). Os rendimentos de esterificação tendem a diminuir com ácidos carboxílicos de cadeia curta; sendo os resultados mais baixos obtidos com o ácido acético (CASTRO, OLIVEIRA, SOARES, 1997; WELSH; WILLIAMS, 1989). Neste contexto, a fonte de lipase e a polaridade do doador do grupo acila são fatores críticos que devem considerados no estabelecimento das condições adequadas para se alcançar uma eficiente transformação do substrato em produto por catálise enzimática.

1.2 TRABALHOS ANTERIORES DESENVOLVIDOS

O Laboratório de Biocatálise da Escola de Engenharia de Lorena /USP, vem trabalhando de forma continuada em processos biocatalíticos há mais de vinte anos. Considera-se que o desenvolvimento da Biocatálise e em particular da biocatálise em meios não convencionais tem importância ímpar no Brasil pela necessidade de conciliar o desenvolvimento industrial com a preservação dos seus ecossistemas.

Motivado pelo potencial de aplicação das lipases na obtenção de produtos de maior valor agregado e das vantagens associadas ao uso deste biocatalisador em meio não aquoso, o Grupo de Biocatálise da EEL/USP, tem se dedicado ao desenvolvimento de linhas de pesquisa referentes à aplicação desta enzima em processos de valorização de óleos vegetais e microbianos visando a produção de aromas, biocombustíveis, biolubrificantes e emulsificantes. Paralelamente estão sendo também realizados trabalhos experimentais para estabelecer metodologias de imobilização de lipases de diferentes fontes em diversos tipos de suportes para condução de processos em reatores enzimáticos operando em regime descontínuo ou contínuo.

Diante das perspectivas apontadas e tendo como base os trabalhos anteriormente realizados, no presente projeto de tese, os estudos foram direcionados para a obtenção de ésteres por esterificação enzimática do óleo fúsel com diferentes ácidos carboxílicos utilizando lipase imobilizada visando obter produtos com propriedades aromáticas, emulsificantes e biolubrificantes.

1.3 OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é sintetizar ésteres a partir da matéria-prima residual óleo fúsel utilizando lipases como catalisadores por meio da avaliação da esterificação do óleo fúsel com diferentes ácidos carboxílicos (C8:0, C12:0 e C18:1). Levando em consideração estes aspectos, o objetivo global do projeto foi alcançado mediante a execução das seguintes etapas, que podem ser visualizadas como objetivos específicos:

- ✓ Esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico (C8:0):
 - Seleção de fontes comerciais de lipase com potencial para aplicação nas reações de esterificação propostas, utilizando meios sintéticos contendo álcool isoamilíco e ácido caprílico;
 - Estabelecimento das condições reacionais da síntese de caprilato de isoamila avaliando o efeito das variáveis: temperatura e razão molar ácido/álcool, utilizando óleo fúsel como fonte de alcoóis;
 - Purificação e caracterização dos ésteres formados, incluindo avaliação sensorial empregando nariz eletrônico.

✓ Esterificação do óleo fúsel com ácido láurico (C12:0):

- Seleção de fontes comerciais de lipase com potencial para aplicação nas reações de esterificação propostas, utilizando meios sintéticos contendo álcool isoamilico e ácido láurico;
- Estabelecimento das condições reacionais da síntese de laurato de isoamila utilizando reator em batelada e reator de leito fixo operando em fluxo contínuo;
- Purificação e caracterização dos ésteres formados.

✓ Esterificação do óleo fúsel com ácido oleico (C18:1):

- Estabelecimento das condições reacionais da síntese de oleato de isoamila utilizando reator em batelada e reator de leito fixo operando em fluxo contínuo;
- Purificação e caracterização dos ésteres formados.

1.4 ESTRUTURA DA TESE

No primeiro Capítulo apresenta-se uma introdução geral abordando a utilização do óleo fúsel como matéria-prima na síntese de ésteres por via biotecnológica com aplicação da enzima lipase em função de sua versatilidade e estabilidade catalítica em meios orgânicos. O Capítulo também inclui os objetivos propostos e a estrutura do trabalho. No segundo Capítulo são abordadas as informações gerais sobre os processos enzimáticos em meio orgânico, propriedades e mecanismo de ação das lipases, fatores que interferem a síntese de ésteres catalisada por lipases, utilização do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres e reatores enzimáticos. No Capítulo 3 descreve-se a metodologia geral destacando os materiais, métodos de análises para o monitoramento das reações de esterificação do óleo fúsel com os diferentes ácidos carboxílicos (C8:0, C12:0 e C18:1). Nos Capítulos 4, 5 e 6 são apresentados os resultados obtidos na forma de artigos publicados e/ou submetidos divididos por cada ácido carboxílico utilizado nas diferentes etapas do processo. As considerações finais do trabalho desenvolvido, bem como sugestões para trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 7.

REFERÊNCIAS

- ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D. A.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2148-2156, 2011.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475-6490, 2013.
- BI, F.; ALI, A.; IQBAL, S.; ARMAN, M.; HASSAN, M-UL. Chemical esterification of fusel oil alcohol for the production of flavor and fragrance esters **Journal of Chemical Society of Pakistan**, v. 30, p. 919-923, 2008.
- BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D. D. A.; MATOS, I. L.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: an overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481-510, 2015.
- CALAM, A.; SOLMAZ, H.; UYUMAZ, A.; POLAT, S.; YILMAZ, E.; IÇINGUR, Y. Investigation of usability of the fusel oil in a single cylinder spark ignition engine. **Journal of the Energy Institute**, v. 88, p. 258-265, 2015.
- CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-79, p. 817-826, 1999.
- CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; RIBEIRO, R. R. Biotransformação de óleo fúsel em ésteres aromatizantes: influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. In: XVII Simpósio Ibero-Americano de Catálise, 2000, Porto. FEUP Edições, 2000. v. 1. p. 793-794.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 224-228, 1997.
- CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.
- DORMO, N.; BELAFI-BAKO, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 229-234, 2004.
- DHAKE, K. P.; THAKARE, D. D.; BHANAGE, B. M. Lipase: a potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, p. 71-83, 2013.
- FELIPE, L. O.; OLIVEIRA, A. M.; BICAS, J. L. Bioaromas and perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 141-153, 2017.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793-1806, 2015.

KIRDI, R.; AKACHA, N. B.; MESSAOUDI, Y.; GARGOURI, M. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 4, p. 413-422, 2017.

KÜÇÜK, Z.; CEYLAN, K. Potential utilization of fusel oil: a kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 22, p. 289-300, 1998.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Food Science and Technology**, v. 17, n. 2, p. 115-119, 1997.

MAYER, F. D.; FERIS, L. A.; MARCILIO, N. R.; STAUDT, P. B.; HOFFMANN, R.; BALDO, V. Influence of fusel oil components on the distillation of hydrous ethanol fuel (HEF) in a bench column. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 32, n. 2, p. 585-593, 2015.

PATIL, A. G.; KOOLWAL, S. M.; BUTALA, H. D. Fusel oil: composition, removal and potential utilization. **International Sugar Journal**, v. 104, p. 51-58, 2002.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M.; YUSOP, R. M.; SALIH, N. Synthesis, reactivity and application studies for different biolubricants. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 16, 2014.

STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A. M.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 6, p. 1565-1568, 1989.

XIONG, D. L.; LI, J. H. ZHONG, H. M. Purification & separation of fusel oil and its application. **Liquor Making Science and Technology**, v. 4, n. 166, p. 65-74, 2008.

YAHYA, A. R.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As lipases estão entre os biocatalisadores mais importantes utilizados em reações químicas tanto em meio aquoso como não aquoso e isto se deve principalmente à sua habilidade de utilizar um amplo espectro de substratos, além da sua alta estabilidade entre extremos de temperatura, pH e solventes orgânicos, e sua quimio, regio e enantiosseletividade (FABER, 2011; CASTRO et al., 2004; KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). Em 2015, DAIHA et al. analisaram o número de publicações e patentes relacionados ao uso de lipases, com base em alguns setores industriais em diferentes estágios de desenvolvimento e com diferentes níveis tecnológicos. Segundo esses autores, o uso das lipases como biocatalisadores ainda é relevante para o setor industrial desde a descoberta de seu potencial por Haldane em 1930, com aumento projetado na demanda mundial de 6,2% por ano, tendo atingido US\$ 345 milhões em 2017. Entre as possíveis aplicações desses biocatalisadores a produção ésteres com diferentes propriedades é a que apresenta maior número de documentos, incluindo patentes e publicações científicas. Neste capítulo, será dada ênfase aos conceitos básicos que introduziram a proposta do uso de enzimas em meios não convencionais, bem como abordadas as condições e sistemas reacionais utilizados na produção de ésteres catalisada por lipases.

2.1 Processos enzimáticos em meio orgânico

Os processos enzimáticos vêm sendo estudados como rotas alternativas para a produção de diversos insumos químicos. O emprego de enzimas como agente de transformação tem oferecido novas perspectivas para a solução de vários problemas, substituindo com sucesso a metodologia química tradicional (FABER, 2011; BIROLI et al., 2015). As enzimas já competem com outros catalisadores - inclusive metais de transição - na obtenção de centros quirais. Estas são constituídas de proteínas ou glicoproteínas e se caracterizam pela especificidade em relação ao substrato, algumas atuando num limitado grupo de compostos, enquanto outras agem sob um único substrato (STEPANKOVA et al., 2013; SCHMID et al., 2001).

Os processos enzimáticos por muito tempo só eram empregados em meio aquoso, principalmente devido a concepção de que este era um adequado ambiente para a manutenção da conformação estrutural da enzima na forma ativa. Esse conceito, entretanto, foi reformulado em função de muitas enzimas (ou complexos enzimáticos) serem cataliticamente ativas em ambientes hidrofóbicos naturais com eficiência similar àquela em

soluções aquosas, ou em certos casos, até superior. As enzimas são cataliticamente ativas em meio orgânico porque elas permanecem na sua conformação original. A incapacidade da proteína de se desdobrar em meio não aquoso deve-se, em parte, ao fato das interações eletrostáticas entre os grupos integrantes da enzima serem aumentadas em solventes orgânicos, devido à baixa constante dielétrica da maioria dos solventes e também ao aumento do número de ligações de hidrogênio intramoleculares (IYER; ANANTHANARAYAN, 2008; LIMA; ANGNES, 1999).

Em sentido estrito, podem ser considerados como ambientes não aquosos os solventes orgânicos, os fluidos supercríticos, os gases, os substratos líquidos ou misturas eutéticas de substratos livres de solventes (DOUKYU; OGINO, 2010; LIMA; ANGNES, 1999).

A literatura especializada nesta área é vasta tendo em vista o interesse científico demonstrado no sentido de elucidar as propriedades e o comportamento de enzimas em meios não aquosos (FABER, 2011; BRINK et al., 1988). Consequentemente, o número de rotas de síntese que incorporam um passo enzimático torna-se cada vez mais crescente. Ilustrativos são os trabalhos de revisão de literatura publicados numa edição especial do periódico *Biotechnology Advances* sob o título “Recent Advances in Applied Biocatalysis and Biotechnology”, que reúne exemplos importantes, sob o ponto de vista de síntese orgânica, de reações catalisadas por diferentes classes de enzimas (PALOMO; FILICE, 2015; BIROLI et al., 2015).

A catálise enzimática em meio orgânico possui potencialidade para a aplicação em síntese (separação de álcoois ou ácidos racêmicos, síntese de peptídeos) e na indústria (síntese de aspartame, interesterificação de óleos e gorduras). A classe de enzima que tem um número amplo de aplicações em catálise em meio orgânico, pertence ao grupo das hidrolases, particularmente, as lipases. As razões desse potencial biotecnológico das lipases incluem fatos relacionados com sua elevada estabilidade em solventes orgânicos, propriedades enantiosseletivas, versatilidade catalítica, disponibilidade comercial, além de não requererem cofatores (KAPOOR; GUPTA, 2012; DAIHA et al., 2015).

O reconhecimento das vantagens da utilização de lipases (Figura 2.1) em substituição aos processos químicos tradicionais indica que as lipases podem adquirir potencial no comércio de enzimas. Logo, o desenvolvimento tecnológico das lipases para a síntese de novos compostos, resultará na sua expansão em novas áreas e maior impacto na área industrial (DAIHA et al., 2015).

Figura 2.1 - Vantagens das reações catalisadas por lipases em meio orgânico, incluem ampla variedade de reações químicas que não são viáveis em soluções aquosas e também outras aplicações.

Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2016.

2.2 Lipases

2.2.1 Fontes

As lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) são comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. Inicialmente, eram obtidas a partir do pâncreas de animais e usadas como auxiliar digestivo para consumo humano. Atualmente as lipases são produzidas, preferencialmente, a partir de células microbianas devido às facilidades de controle e de aumento da capacidade produtiva dos processos fermentativos, além da redução do custo de obtenção. Em geral, os microrganismos mais utilizados para a produção de lipases são fungos dos gêneros *Rhizopus*, *Aspergillus* e *Mucor*, bactérias do gênero *Pseudomonas* e leveduras do gênero *Candida*, conforme ilustrado no Quadro 2.1, que apresenta lipases produzidas a partir de diferentes fontes microbianas e comercializadas por diversas companhias, juntamente com seu nome comercial.

Quadro 2.1 - Exemplos de lipases disponíveis comercialmente.

Classe	Fonte	Nome Comercial	Companhia
Fungos	<i>Aspergillus niger</i>	Lipase A	Amano
		Sunzyme – NLS	Shinnihon Chem.
		Palatase	Novozymes
	<i>Humicola lanuginosa</i>	Chirazyme L	Biocatalysts
		Lipase SP524	Novozymes
	<i>Mucor javanicus</i>	Lipase M	Amano
	<i>Mucor miehei</i>	Lipozyme	Novozymes
	<i>Penicillium camembertii</i>	Lipase G	Amano
	<i>Rhizopus oryzae</i>	Lipase F	Amano
		Lipase LO36P	Biocatalyst
	<i>Rhizopus delemar</i>	Talipase	Amano
		Lipase D	Amano
Leveduras	<i>Rhizopus japonicus</i>	Lipase Saiken	Osaka Saiken
		Lipase Saiken 100	Nagase
	<i>Rhizopus niveus</i>	Newlase F	Amano
	<i>Candida antarctica</i>	Novozym 435	Novozymes
	<i>Candida cylindracea</i>	Lipase OF 360	Meito Sangyo
	<i>Candida lipolytica</i>	Lipase L	Amano
Bactérias	<i>Candida rugosa</i>	Tipo VII	Sigma
		Lipase AY30	Amano
	<i>Achromobactor</i> sp.	Lipase AL	Meito
	<i>Alcaligenes</i> sp.	Lipase PL	Meito
	<i>Pseudomonas</i> sp.	Lipase PS	Amano
		Lipase AK	Amano

Fonte: Adaptado de FABER, 2011.

Apesar das lipases de fontes distintas serem capazes de catalisar a mesma reação, os desempenhos de cada uma delas, sob as mesmas condições de reação, podem ser diferentes (SUMBY; GRBIN; JIRANEK, 2010; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

2.2.2 Propriedades

Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente, apresentando, em sua maioria, atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 a 55 °C (Tabela 2.1). Contudo, a termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica. Em geral, lipases são ativas numa ampla faixa de pH 5 a 9, com máximo situado entre 6 a 8 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; KRISHNA; KARANTH, 2002).

Tabela 2.1 - Propriedades bioquímicas de algumas lipases microbianas de acordo com os fabricantes.

Propriedades	Fontes de Lipase				
	<i>Candida rugosa</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Penicillium camembertii</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Massa molecular	63 kDa	45 kDa	48 kDa	37 kDa	28-67 kDa
Especificidade	não específica	não específica	não específica	não específica	1,3 específica
Temperatura ótima (°C)	40	50	55	45	37
pH ótimo	7,5	7 a 8	8	5	3 a 8

Fonte: Adaptado de FABER, 2011.

2.2.3 Especificidade e regiosseletividade

Quatro classes de especificidade podem ser definidas. A primeira refere-se à classe de lipídeos. A enzima pode ser específica em relação ao tipo de éster, como por exemplo, tri-, di- ou monoacilgliceróis, éster de glicerol, ésteres de metila, entre outros. A segunda é a regiospecificidade, que promove a seletividade da enzima pela posição da ligação éster numa molécula. O terceiro tipo é a especificidade em relação ao resíduo de ácido graxo, no qual a lipase é específica ao comprimento da cadeia ou a presença da dupla ligação na cadeia do resíduo de ácido graxo (KAPOOR; GUPTA, 2012).

1) Lipases não específicas: Catalisam a hidrólise completa do triacilglicerol em ácidos graxos e glicerol, apresentando mono e diacilgliceróis como intermediários, atuando de modo aleatório. As lipases de *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Pseudomonas* sp pertencem a este grupo.

2) Lipases 1,3 específicas: Na presença dessas lipases, os triacilgliceróis são hidrolisados nas ligações dos C1 e C3 do glicerol produzindo ácidos graxos, 2-monoacilgliceróis e 1,2 ou 2,3 diacilgliceróis, ambos quimicamente instáveis, ocorrendo migração do grupo acila para produzir 1,3 diacilgliceróis e 1 ou 3 monacilgliceróis (Figura 2.2). Pertencem a este grupo as lipases de *Aspergillus niger*, *Mucor miehei*, *Rhizopus delemar* entre outras.

obtenção de ésteres, alcoóis e ácidos opticamente puros (KRISHNA; KARANTH, 2002; DAIHA et al., 2015).

A indústria farmacêutica tem demonstrado grande interesse nesta área, visto que a atividade biológica de muitas drogas racêmicas muitas vezes reside em um único enantiômero. Sintetizar tais drogas em sua forma enantiomérica pura está se tornando um caminho importante na química da biotransformação. Drogas como Naproxen (agente antiinflamatório), Cloranfenicol (agente antimicrobiano), Atenolol (usado no tratamento de hipertensão) e a cadeia lateral do Taxol (usado no combate ao câncer) têm sido resolvidos por catálise enzimática. A aplicação da resolução enzimática na indústria farmacêutica é extensa (DAIHA et al., 2015).

Como exemplo de aplicação na indústria de perfumaria, pode-se citar o citronelol um produto natural, que possui em sua estrutura química um carbono assimétrico consequentemente pode existir nas formas de dois enantiômeros, R e S. Ambos são usados industrialmente, apesar de apresentarem aromas diferentes. AGUIAR et al. (2001) utilizaram Lipozyme para discriminar entre os enantiômeros de uma mistura racêmica de butirato de citronila, catalisando seletivamente a reação de alcoólise para a obtenção do enantiômero desejado (Figura 2.3).

Figura 2.3 - Esquema da alcoólise de uma mistura racêmica de butirato de citronila.

Fonte: AGUIAR et al., 2001.

2.2.4 Estrutura e mecanismo de ação das lipases

A estrutura tridimensional da lipase fúngica de *Rhizomucor miehei* e da lipase pancreática humana foi determinada em 1990 (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; JAEGER; REETZ, 1998). Até 1998, entre as 12 estruturas de lipases elucidadas, todas eram membros da família “entrelace α/β hidrolase”, com uma arquitetura comum composta de uma sequência de α hélices e fitas β (MENDES; OLIVEIRA; CASTRO, 2012; SCHMID; VERGER, 1998).

O cerne da lipase é composto de uma lâmina β central, a qual consiste de oito diferentes fitas β ($\beta 1$ - $\beta 8$) conectadas por seis α hélices (A-F). O sítio catalítico é formado por uma tríade catalítica (três aminoácidos), consistindo dos aminoácidos serina, aspartato (ou glutamato) e histidina; o resíduo nucleofílico de serina é localizado no C-terminal da fita $\beta 5$, num pentapeptídico altamente conservado, GX SXG, o qual forma um “motivo” característico β -giro- α , chamado de “cotovelo nucleofílico” (BARRIUSO et al., 2016; JAEGER; REETZ, 1998).

As lipases atuam na interface óleo/água de emulsões e são ativas inclusive em solventes orgânicos. A hidrólise do substrato inicia com um ataque nucleofílico ao átomo carboxílico da ligação éster pelo oxigênio da serina do sítio catalítico. Ocorre a formação de um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado pelos hidrogênios ligados aos átomos de nitrogênio dos resíduos da cadeia principal da enzima, que pertencem a “cavidade oxianion” (JAEGER; REETZ, 1998).

A cavidade oxianion é uma região eletrofílica em torno do resíduo de serina, criada pela reestruturação conformacional da lipase (HOU; SHIMADA, 2009; PAIVA; BALCÃO; MALCATA, 2000). Um álcool é liberado após a formação do complexo acil-lipase, o qual é finalmente hidrolisado, liberando o ácido graxo e regenerando a enzima (Figura 2.4) (JAEGER; REETZ, 1998).

Um aspecto estrutural comum à maioria das lipases é a presença de uma tampa (*lid*), composta de uma sequência peptídica em α -hélice, que cobre o sítio ativo e, na conformação fechada, isto é, na ausência de uma interface ou solvente, previne o acesso do substrato à tríade catalítica (VERGER, 1997; SCHMID; VERGER, 1998). O lado da tampa voltado para o sítio ativo é composto principalmente de cadeias laterais hidrofóbicas alifáticas, enquanto que a face oposta é hidrofílica e estabilizada pelas interações na superfície a proteína (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). A ativação de lipases na presença de superfícies hidrofóbicas (micelas de substrato, solventes orgânicos imiscíveis, bolha de ar, entre outras), fenômeno conhecido como ativação interfacial, é uma característica importante destas enzimas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; BASTIDA et al., 1998).

O fenômeno de ativação interfacial é geralmente associado com a orientação da estrutura α -hélice da tampa, aumentando a hidrofobicidade da superfície nas vizinhanças do sítio ativo (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Na presença da interface

lipídio/água, a tampa sofre uma mudança conformacional (VERGER, 1997), produzindo a “estrutura aberta”, conferindo funcionalidade à enzima (BASTIDA et al., 1998).

Atualmente é sabido que nem todas as lipases são ativadas por interfaces, como é o caso das lipases de *Pseudomonas glumae* e *Pseudomonas aeruginosa*, e, também, que tanto a qualidade como a quantidade da interface desempenha papel importante na ativação dessas enzimas (KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998). A qualidade da interface, em termos de tensão interfacial, é um dos parâmetros mais decisivos quando se trabalha com enzimas lipolíticas, o que significa que comparações válidas, somente podem ser feitas entre dados obtidos sob condições estritamente idênticas, preferencialmente no mesmo laboratório (VERGER, 1997).

Figura 2.4 - Mecanismo catalítico de lipases baseado na “triade catalítica” de serina (nucleófilo), histidina e aspartato ou glutamato.

Fonte: Adaptado de SCHMID; VERGER, 1998.

2.2.5 Reações catalisadas pelas lipases

As lipases atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. A hidrólise de triacilgliceróis utilizando lipases é uma reação reversível, portanto o equilíbrio pode ser alterado por meio da variação de concentração de reagentes ou produtos. Essas duas reações básicas (hidrólise/ esterificação) podem ser combinadas de modo sequencial fornecendo um grupo de reações denominado de interesterificação (BALCÃO et al., 1996). Dependendo dos materiais de partida as seguintes reações são possíveis: Transesterificação, na qual dois grupos acilas são trocados com dois acilgliceróis. Acidólise, na qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um ácido carboxílico. Alcoólise, na qual o grupo acila é deslocado entre um acilglicerol e um álcool. Essas reações são esquematizadas na Figura 2.5, juntamente com a participação da água, tendo em vista que o teor de água é considerado o fator crítico do processo (CASTRO; ANDERSON, 1995), podendo afetar diretamente a velocidade de reação, extensão de reações paralelas de hidrólise, rendimentos do produto, atividade da enzima e seletividade da reação.

Figura 2.5 - Reações catalisadas pelas lipases.

a – Hidrólise de éster

Na hidrólise, a água é um dos reagentes e deve ser adicionada para catalisar a reação no sentido desejado.

b - Síntese de éster

Na síntese, a água é formada durante o processo na mesma proporção do produto principal e geralmente interfere no equilíbrio reacional quando não são adotadas estratégias de controle e/ ou remoção da quantidade extra de água.

c - Interesterificação

Na interesterificação a água não participa do equilíbrio reacional, entretanto, deve ser fornecida em quantidades mínimas necessárias para manter ativa e estável a preparação enzimática.

c1- Transesterificação

c2- Acidólise

c.3- Alcoólise

Fonte: Adaptado de KAZLAUSKAS; BORNSCHEUER, 1998.

2.2.6 Aplicações potenciais das lipases

A versatilidade das lipases tem sido explorada tanto para substituir processos existentes como para produzir uma série de produtos originalmente considerados praticamente impossível de serem obtidos por rota química convencional. O Quadro 2.2 apresenta de forma resumida as principais aplicações das lipases em meios aquosos e orgânicos.

Quadro 2.2 - Aplicações de lipases conforme tipo de reação catalisada.

Tipos de reações	Áreas de aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise da gordura do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleo	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits para diagnóstico
Esterificação	Química fina	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes
	Alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, flavorizantes e na produção de aromatizantes
	Farmacêutica	Intermediários em medicamentos	Anti-inflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofeno, suprofeno)
Transesterificação	Commodities	Transesterificação em óleos vegetais	Produção de biodiesel

Fonte: Adaptado de ANDUALEMA et al., 2012.

A reação típica catalisada pelas lipases em meio aquoso é a hidrólise de éster. Esta conversão enzimática tem sido usada, por exemplo, na obtenção de ácidos graxos, pela hidrólise de óleos vegetais. O processo enzimático não somente reduz os requerimentos energéticos como também previne a decomposição de alguns ácidos graxos. A hidrólise seletiva da gordura do leite é outro exemplo potencial de aplicação de lipases. Neste caso, a lipase é responsável pela formação do aroma distinto no preparo de queijos do tipo “Cheddar” e para produzir substitutos de manteiga, aroma de queijo e outros aditivos usados na manufatura de cereais, balas, aperitivos e bolos (ANOBOM et al., 2014).

Em meio orgânico, as lipases catalisam a transferência de grupos acila de compostos doadores para uma ampla faixa de compostos aceptores diferentes da água. Entre os possíveis processos catalisados pelas lipases em meio orgânico, a síntese de ésteres se apresenta como uma vertente bastante promissora, conforme atestam os

processos descritos na literatura (KHAN; RATHOD, 2015; GARCIA et al., 1999; LORTIE, 1997).

A esterificação por lipase foi comercializada pela Unichema International para a produção de ésteres de ácidos graxos de alto grau de pureza, como o isopropilmiristato, isopropilpalmitato e 2-etilhexilpalmitato, que são ingredientes empregados na formulação de cremes cosméticos e outros produtos de higiene. O processo permite a recuperação da preparação enzimática e sua reutilização em bateladas consecutivas (NOVO NORDISK, 1995).

2.2.7 Uso de lipases imobilizadas

A estratégia mais utilizada para aumentar as vantagens do uso das lipases é empregá-la na forma imobilizada. Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas em um espaço, separadas por barreiras que permitem seu contato com o substrato no meio de reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio. Nesta técnica, a enzima fica retida no interior (poros) ou na superfície de um material que é utilizado como suporte (CASTRO et al., 2008; BELOT et al., 2001).

A tecnologia de imobilização enzimática envolve basicamente a escolha do suporte e do método de imobilização. Um bom suporte deve ser resistente à contaminação, ter boa resistência mecânica, ser estável termicamente e estar disponível comercialmente por um custo razoável (NIELSEN; BRASK; FJERBAEK, 2008). Além disso, lipases imobilizadas em suportes sólidos são de fácil separação, permitindo assim a sua reutilização em bateladas consecutivas. O empacotamento da enzima imobilizada numa coluna para processamento contínuo também é facilitado, além da imobilização ter um efeito estabilizante para utilização por longo prazo à temperaturas elevadas (NAKAOKI et al., 2005). Para reações de esterificação, por exemplo, num sistema de ácido láurico em iso-octano foi constatado um aumento de 51 vezes na atividade hidrolítica, quando a lipase foi empregada na forma imobilizada em comparação com a sua forma livre (GOTO et al., 2005).

Em geral, a imobilização oferece uma série de vantagens e as razões para a escolha de um catalisador enzimático imobilizado variam de acordo com a aplicação, sendo que o custo da imobilização deve ser compensado pela longa vida do biocatalisador (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). A imobilização também pode alterar as propriedades enzimáticas, resultando em biocatalisadores com atividade, especificidade e estabilidade

aumentadas, dependendo do procedimento de imobilização e da fonte da enzima (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009).

Diversos procedimentos para a imobilização de enzimas têm sido desenvolvidos, objetivando reduzir a perda de atividade catalítica na etapa de imobilização e, conseqüentemente, diminuir o custo do processo pelo uso mais efetivo da atividade atalítica retida na matriz de imobilização. Para minimizar essas desvantagens, torna-se necessário um conhecimento integrado de alguns parâmetros (HANEFELD; GARDOSI; MAGNER, 2009):

- Propriedades do suporte (porosidade, natureza química, hidrofobicidade ou hidrofiliidade, estabilidade química e mecânica, tamanho da partícula);
- Natureza da enzima (tamanho da molécula, flexibilidade conformacional necessária à catálise, presença de regiões hidrofóbicas, presença de regiões hidrofílicas, estabilidade nas condições de imobilização);
- Fatores específicos relativos ao sistema (meio reacional, limitações difusionais, inibição enzimática, precipitação de produtos, viscosidade da mistura, termodinâmica reacional).

2.3 Síntese de ésteres por lipases

Os ésteres podem ser sintetizados a partir de ácidos carboxílicos e alcoóis (esterificação) ou triacilgliceróis e alcoóis (transesterificação) (Figura 2.6). Os ésteres sintetizados por lipases encontram aplicação em numerosos campos como energia (biodiesel e biolubrificante), fármacos (resolução de drogas racêmicas), alimentos (lipídios estruturados e nutracêuticos) e cosméticos (síntese de aromas e emolientes) (FERREIRA-DIAS et al. 2013).

A demanda mundial de ésteres de aromas e sabores, incluindo suas misturas, como os óleos essenciais, extratos naturais e aromas químicos, apresenta uma taxa de crescimento da ordem de 4,3% ao ano, tendo atingido a marca de US \$ 23,5 bilhões em 2014 (KHAN; RATHOD, 2015). A maioria dos compostos de sabores e aromas é de origem natural e muitos deles são difíceis de isolar a partir de sua fonte de origem. Por outro lado, o uso de processos químicos conduz à formação de produtos secundários indesejados e que, portanto, tem a aplicação limitada na indústria de alimentos e bebidas. Desta forma, a síntese enzimática é um método eficaz para a síntese dessas moléculas comparado a rota química convencional (DHAKA et al., 2013).

Figura 2.6 - Esquema da síntese de ésteres por esterificação e transesterificação.

Fonte: Adaptado de KHAN; RATHOD, 2015.

As reações de síntese de éster ocorrem por eliminação de água gerada durante a reação. Portanto, as reações de esterificação ocorrem em baixa atividade de água (KUPERKAR et al., 2014; MACRAE, 1983). A síntese de éster pode ser maximizada com a utilização de substratos que contém excesso do ácido carboxílico ou do álcool (FINDRIK et al., 2012; BRUNO et al., 2004). Na esterificação, a molécula de água é liberada como um produto secundário que possui um potencial de reversibilidade da reação. Consequentemente, a remoção de água a partir do meio reacional torna-se um fator crítico. Várias abordagens, tais como a utilização de solventes orgânicos, agentes de desidratação, peneiras moleculares, membranas especializadas e zeólitas foram relatadas na literatura como técnica de remoção de água do meio reacional (GANDHI et al., 2000). A abordagem clássica envolve a utilização de solventes orgânicos (KUMAR et al., 2016; BEN SALAH et al., 2007), solventes hidrofóbicos, tais como *n*-hexano, *n*-heptano, ciclo-hexano e iso-octano são rotineiramente usados, devido à dificuldade de penetrar na camada de água em volta da superfície da enzima. No entanto, um processo que utiliza solventes orgânicos não pode ser considerado ecologicamente correto, portanto, o uso de sistemas isentos de solventes é a opção preferida, apesar dos problemas de limitações de transferência de massa e baixas taxas de reação (FINDRIK et al., 2012; LONGO; SANROMÁN, 2006).

Os efeitos do ácido orgânico e/ou comprimento da cadeia de álcool são significativos em reações de esterificação por lipase, que procedem da ligação enzima-substrato. Sem dúvida, este é um fator entre muitos, que mais afeta a ligação da enzima ao substrato e a conversão do substrato em produto (STERGIOU et al., 2013).

A Tabela 2.2 apresenta alguns exemplos de ésteres sintetizados por catálise enzimática.

Tabela 2.2 - Visão geral de síntese de ésteres sintetizados por catálise enzimática.

Receptor de acila	Doador de acila	Produto	Fonte de lipase	Solvente	Tempo	Rendimento
Butanol	Ácido acético	Acetato de butila	<i>Rhizopus oryzae</i>	Isento de solvente, hexano, heptano	24 h	60%, 80%, 76%
Álcool isoamílico	Ácido acético	Acetato de isoamila	<i>Rhizomucor miehei</i>	n-heptano	72 h	>95%
Álcool isoamílico (obtido a partir de óleo fúsel)	Ácido acético	Acetato de isoamila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	Isento de solvente	4 – 8 h	75%
Geraniol	Ácido acético	Acetato de geranila	<i>C. antarctica</i> (CAL-B)	Iso-octano	120 h	83,2-98,2%
n-Butanol	Ácido acético	Acetato de n-butila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	n-hexano	24 h	90%
Butanol	Ácido butírico	Butirato de butila	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em estireno-divinilbenzeno	n-hexano	~ 5 h	14,5 mmol g ⁻¹ h ⁻¹
Etanol	Ácido butírico	Butirato de etila	<i>Candida antarctica</i>	n-heptano	96 h	72,9%
L-Mentol	Ácido butírico	Butirato L-Mentila	<i>Candida rugosa</i>	n-hexano	8,7 h	72,6%
Álcool isoamílico	Ácido propílico	Propanato de isoamila	Crude HPL	Isento de solvente	12 h	60-93 %
Etanol	Ácido valérico	Valerato de etila	<i>Staphylococcus simulans</i> lipase imobilizada em CaCO ₃	Isento de solvente	72 h	51%
Etanol	Ácido hexanóico	Hexanoato de etila	<i>Rhizopus chinensis</i>	Heptano	72 h	96,5%
(Z)-3-Hexan-1-ol	Ácido capróico	Caprilato de (Z)-3-Hexan-1-ila	Lipase de semente germinada	Solventes orgânicos	48 h	88%
Álcool isoamílico	Ácido capróico	Caprilato de isoamila	Crude HPL	Isento de solvente	12 h	77-97 %
Álcool cetílico	Ácido capróico	Caprilato de cetil	Lipozyme RMIM (<i>Rhizomucor miehei</i>)	n-Hexano	5 h	~94%
Álcool cetílico	Ácido capróico	Caprilato de cetil	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	n-Hexano	5 h	~98%

Continua...

Continuação...

Tabela 2.2 - Visão geral de síntese de ésteres sintetizados por catálise enzimática.

Receptor de acila	Doador de acila	Produto	Fonte de lipase	Solvente	Tempo	Rendimento
β- Citronelol	Ácido láurico	Laurato de citronila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	Heptano	2 h	53%
Álcool cinamil	Ácido láurico	Laurato de cinamila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	Tolueno	2 h	60%
1-Hexanol	Ácido láurico	Laurato de hexila	<i>Rhizomucor miehei</i>	n-Hexano	74,8 min	~97%
Álcool isoamílico	Ácido mirístico	Miristato de isoamila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	Isento	1 h	96%
Álcool isopropanol	Ácido palmítico	Palmitato de isopropila	Novozym 435 (<i>Candida antarctica</i>)	Solvente orgânico	2 h	~87%
Álcool de oleíla	Ácido oleico	Oleato de oleíla	<i>Candida antartica</i>	n-Hexadecano	5 min	>90%
Etanol	Ácido oleico	Oleato de etila	<i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em Accurel EP700	Solvente orgânico	24 h	~57%
Glicerol	Ácido oleico	Monoglicerídeo (MAG) Diglicerídeo (DAG)	Lipase <i>Candida</i> sp. 99-125	Isento	8 h	49,6%
1-Octanol	Ácido oleico	Oleato de otila	Lipozyme RMIM (<i>Rhizomucor miehei</i>)	SC-CO ₂	5 h	88%

Fonte: Adaptado de KHAN; RATHOD, 2015.

A síntese de ésteres por esterificação envolve uma série de parâmetros dependentes da fonte de lipase, forma do biocatalisador (livre ou imobilizado), polaridade do meio reacional; razão molar entre álcool e ácido, entre outras variáveis. Geralmente o estabelecimento das condições adequadas para cada modelo de estudo é efetuada adotando a ferramenta de planejamento fatorial.

RODRIGUEZ-NOGALES; ROURA; CONTRERAS (2005) utilizaram a metodologia de superfície de resposta para determinar as condições ótimas para a esterificação do etanol com o ácido butírico utilizando lipase de *Candida antarctica* imobilizada como catalisador. Vários parâmetros da reação foram investigados, incluindo a razão molar do ácido em relação ao álcool, concentração de enzima, temperatura e tempo de reação que afetam a síntese de butirato de etila. Os principais parâmetros que influenciam o rendimento de esterificação foram temperatura de incubação e concentração de substrato. As condições ótimas para a reação enzimática foram obtidas a 0,04 mol L⁻¹ de concentração de substrato utilizando a concentração de enzima de 7% a 34 °C durante 96 h. Nestas condições, a porcentagem de esterificação foi de 72,9%.

CASTRO; OLIVEIRA; SOARES (1997a) investigaram a influência de diversos parâmetros operacionais, tais como: a polaridade e natureza do solvente e a razão molar entre butanol e ácido butírico, na síntese do butirato de butila utilizando Lipozyme como biocatalisador. Neste trabalho o solvente heptano foi selecionado por apresentar total compatibilidade com sistema reacional estudado. Os valores referentes aos coeficientes de partição (Lipozyme/ reagente e Lipozyme/ produto) indicaram que o éster formado foi transferido para a fase orgânica, direcionando, desta forma, o sentido da reação de síntese. O uso do planejamento fatorial mostrou ser uma ferramenta importante para otimizar a síntese do butirato de butila. De acordo com o estudo efetuado, elevadas conversões do n-butanol foram obtidas (> 95%) empregando concentração elevada de lipase (30% em relação à massa total dos reagentes), em presença de agente dessecante (20% m/v) e numa razão molar entre o butanol e o ácido butírico de 0,6.

Na síntese do butirato de citronela (CASTRO; OLIVEIRA; SOARES, 1997 b) foi estudada a influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool terpeno, tendo sido observado que os ácidos de cadeia alifática contendo quatro ou mais carbonos foram excelentes substituintes no grupo acila, fornecendo taxas de esterificação entre 95 a 98%. Foi também verificado que, este tipo de preparação de lipase imobilizada (Lipozyme) apresenta sérias limitações para aplicação em reações de esterificação de alcoóis secundários e terciários, sendo, portanto, recomendado seu uso

apenas na síntese de ésteres terpenóides derivados de alcoóis primários como citrionelol, geraniol e nerol.

BEZBRADICA et al. (2007) estudaram o efeito da polaridade do substrato na síntese de ésteres de aroma catalisada por lipases (lipase de pâncreas suíno e lipase de *Rhizomucor miehei*) na presença e ausência de solventes. A redução dos teores de ésteres de ácido butanoico formados, na ausência de solvente orgânico foi observada, enquanto os rendimentos elevados foram observados na síntese de ésteres de ácido octanóico, em ambos os sistemas (livre de solvente e com solvente orgânico). Ambas lipases apresentaram comportamentos semelhantes, embora a lipase de *Rhizomucor miehei* tenha demonstrado menor suscetibilidade à influência negativa do ácido butanoico.

BASSI et al. (2016) estudaram a síntese de oleato de octila por reação de esterificação enzimática de n-octanol com ácido oleico. Lipases de pâncreas suíno (PPL), *Mucor javanicus* (MJL), *Candida* sp. (CALA), *Rhizomucor miehei* (RML) e *Thermomyces lanuginosus* (TLL) foram imobilizadas por ativação interfacial em partículas de polimetacrilato (PMA) e testadas como biocatalisadores nas reações de esterificação. Entre essas, a lipase de TLL-PMA foi a mais ativa na síntese de oleato de octila, alcançando uma conversão de 95% em 60 min de reação. Também foi observado que o biocatalisador manteve sua atividade original após doze ciclos de reação de 60 min cada.

2.4 Fatores que interferem na síntese de ésteres catalisada por lipases

Nas reações de esterificação/hidrólise catalisadas pelas lipases, o conteúdo de água afeta a posição de equilíbrio das reações como também a distribuição dos produtos do meio. A importância da água é muito mais marcante com o entendimento dos vários tipos de meios de reação e materiais do suporte. Além disso, a água, o meio e o suporte são inertes e geralmente interagem com outros fatores afetando a reação. Desta forma, é necessário um rígido controle do teor de água no meio reacional e um compromisso entre a insolubilidade dos substratos em solventes apolares e o grau de desnaturação da enzima. Os mecanismos que envolvem o controle destes parâmetros são extremamente complexos, principalmente com relação ao teor de água presente no meio reacional, que pode ter origem a partir de diversas fontes, conforme descrito a seguir: água oriunda do solvente e substratos; água presente na enzima, água no suporte de imobilização (se presente) e água formada durante a reação.

2.4.1 Influência do solvente

A natureza do solvente orgânico é um fator importante a ser considerado na catálise enzimática em meio não aquoso, pois o solvente não apenas afeta a estabilidade da enzima, como também modifica sua especificidade.

Os efeitos do solvente sobre a velocidade de reação da catálise enzimática em sistemas de uma ou duas fases podem ser diretos ou indiretos (KASCHE et al., 1991). Os efeitos indiretos compreendem a partição de reagentes e de produtos, a alteração do equilíbrio químico e a transferência de massa em sistemas de duas fases. Os efeitos diretos são responsáveis pela redução da atividade e pela inativação (desestabilização) da enzima por meio de dois mecanismos: primeiramente, pela interação solvente-enzima que altera a conformação nativa da enzima devido à penetração do solvente no âmagô hidrófobo da proteína provocando a clivagem das ligações de hidrogênio e das interações hidrofóbicas (LIMA; ANGNES, 1999). Uma exceção seria a estabilização conformacional adquirida pela enzima em meio não aquoso, por meio do “efeito gaiola”. Neste caso, as moléculas das enzimas, estariam firmemente espremidas pelas moléculas ao seu redor à semelhança das enzimas imobilizadas (LIMA; ANGNES, 1999).

Outra maneira na qual os solventes afetam a atividade é por interação direta com a água essencial ao redor da molécula enzimática (HERBST et al., 2012; GORMAN; DORSDISCK, 1992). Solventes altamente polares são capazes de absorver água avidamente e retirar a camada de hidratação da enzima, provocando a perda das propriedades catalíticas por inativação e desnaturação. Reciprocamente, os solventes hidrofóbicos, por serem menos capazes de arrastar “para fora” ou deformar a camada de hidratação, podem apenas afetar parcialmente a atividade catalítica.

Muitas maneiras diferentes têm sido descritas na literatura para quantificar a hidrofobicidade. De acordo com LAANE et al. (1987), o Log P é o mais importante indicador de hidrofobicidade por apresentar a melhor correlação com atividade enzimática. Desta maneira, o Log P, definido como o logaritmo do coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/ água foi introduzido como uma medida quantitativa da polaridade do solvente. Os solventes mais adequados são os que apresentam $\text{Log P} > 2$. Segundo CARTA et al. (1992) a biocatálise das reações de síntese, tais como as esterificações, são geralmente consideradas possíveis em solventes imiscíveis em água, que apresentam $\text{Log P} > 4$. Log P de alguns solventes orgânicos estão listados na Tabela 2.3.

Apesar da ampla utilização do Log P como parâmetro para ser relacionado com atividade enzimática, algumas discrepâncias têm sido relatadas. RESLOW et al. (1988) mostraram que a inclusão do parâmetro solubilidade de Hildebrand (δ) em água ajudava na relação solvente orgânico/atividade enzimática. VALIVETY et al. (1992), mostraram que a atividade catalítica era melhor relacionada como uma função não só de Log P, mas também com o índice de aceitação de elétrons ou polarizabilidade. Posteriormente, Yang; Robb (1994) verificaram que não havia nenhuma relação satisfatória entre a atividade do biocatalisador e o Log P.

Outras propriedades do solvente têm sido relacionadas com a atividade enzimática. Por exemplo, a atividade álcool desidrogenase aumentou com a diminuição da constante dielétrica do solvente e uma relação linear foi observada entre a atividade da lipase e o $S_{w/\sigma}$ (solubilidade molar da água em um solvente ou Log P) (HALLING, 1990).

Tabela 2.3 - Log P de alguns solventes orgânicos.

Solvente	Log P	Solvente	Log P
Triglima	-1,90	Clorofórmio	2,00
Diglima	-1,30	2-4-Dimetil-3-pentanol	2,30
N-N-Dimetilformamida	-1,00	3-Etil-3-pentanol	2,30
Monoglima	-0,75	2-Metil-2-hexanol	2,30
Acetonitrila	-0,33	Trifluorotricloroetano	2,80
Acetona	-0,23	Butiléter	2,90
1-Metil-2-pirrolidona	-0,20	2,6-Dimetil-4-heptanol	3,40
2-Butanona	0,28	Hexano	3,50
Diclorometano	0,60	Pentiléster	3,90
2-Metil-2-propano	0,79	Isoamiléter	4,00
2-Pentanona	0,80	1-Octano	4,20
3-Pentanona	0,80	Feniléter	4,30
Etiléter	0,85	Isoctano	4,50
1,2-Dicloroetano	1,20	1-Noneno	4,70
2-Metil-2-butanol	1,30	Hexiléter	5,00
4-Metil-pentanona	1,30	Nonano	5,10
tert-Butilmetiléter	1,40	Decano	5,60
2-Metil-2-pentanona	1,80	1-Dodecano	6,20
3-Metil-3-pentanol	1,80	Dodecano	6,60

Fonte: JANSSENS et al., 1993.

É também possível prever o efeito do solvente sobre o equilíbrio da reação utilizando dados sobre a distribuição dos componentes nas fases do sistema líquido-líquido. Substratos e produtos vão se dividir entre as fases nos sistemas de duas fases

(aquoso-orgânico). O coeficiente de partição (P) de um composto é usualmente definido como a razão entre as suas concentrações na fase orgânica e aquosa. Para obter elevadas concentrações de produto é essencial utilizar um solvente orgânico cujo coeficiente de partição do produto seja alto. Isto implica em uma eficiente extração do produto para a fase orgânica, o que produz uma conversão mais elevada (YANG; ROBB, 1994).

2.4.2 Influência do teor de água

As propriedades solventes da água resultam das forças atrativas fortes (as pontes de hidrogênio) que existem entre as suas moléculas. A molécula de água e seus produtos de ionização, H^+ e OH^- , influenciam profundamente a estrutura, automontagem e as propriedades das enzimas. As biomoléculas polares dissolvem-se facilmente na água (hidrofílicas) porque elas podem substituir as interações de molécula água-água, energeticamente favoráveis, por interações do tipo pontes de hidrogênio e eletrostáticas, ainda favoráveis, no sistema água-soluto. A variação da entalpia (ΔH) pela dissolução desses solutos é, geralmente, pequena. Diferentemente, moléculas não polares interferem com as interações água-água e são muito pouco solúveis na mesma água (hidrofóbicas). Estas moléculas não polares tendem, quando em solução aquosa, a agregarem-se de forma a minimizar os efeitos energeticamente desfavoráveis provocados pela sua presença (HUTCHEON; HALLING; MOORE, 1997).

Biomoléculas como as enzimas são anfipáticas, possuindo regiões superficiais polares (ou carregadas) e não polares. Em um ambiente aquoso, essas duas regiões da molécula experimentam tendências conflitantes; a região hidrofílica interage favoravelmente com a água enquanto a região hidrofóbica tem a tendência de evitar o contato com a água. Assim, os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das enzimas agregam-se para apresentar a menor área hidrofóbica possível à água (ficam confinados no interior da molécula proteica) e as regiões polares são arranjadas para maximizar as interações com o solvente aquoso.

Quando a água é substituída por um solvente orgânico, alterações na conformação nativa da enzima podem ocorrer tanto na estrutura terciária como nas mais proeminentes estruturas secundárias (α -hélice e a conformação β) acarretando, desta maneira, a sua desestabilização. Com o objetivo de assegurar uma conformação enzimática cataliticamente ativa em meio orgânico, a molécula de enzima deve ter uma camada de hidratação definida (CASTRO; ANDERSON, 1995), separando o solvente do contato com a superfície da proteína e contribuindo para o aumento da sua flexibilidade interna.

Quando a água é adicionada a um sistema enzimático não aquoso, ela é distribuída entre solvente, enzima, substrato e suporte (se presente). A quantidade de água ligada às moléculas de enzima é fundamental para a atividade catalítica em meio não aquoso. A explicação mais provável para esse comportamento advém do fato da água aumentar a mobilidade e a flexibilidade dos sítios ativos e, concomitantemente, a polarização da estrutura proteica.

Alguns trabalhos pioneiros (ROSS; SCHNEIDER, 1991; ZAKS; KLIBANOV, 1988) foram primordiais para o melhor entendimento e estabelecimento de técnicas visando determinar a quantidade adequada de água para proporcionar elevada atividade enzimática em meio orgânico. ZAKS; KLIBANOV (1988) examinaram três modelos de enzimas - polifenoloxidase, álcool desidrogenase e álcool oxidase - em solventes de hidrofobicidades e conteúdos de água diferentes. Os autores mostraram que a atividade enzimática estava relacionada à quantidade de água ligada às proteínas e não à concentração de água nos solventes orgânicos. A água ligada àquelas enzimas em solventes orgânicos não formaria uma camada de água verdadeira, mas, de preferência, uns poucos “clusters”, provavelmente, em torno de regiões carregadas e polares da superfície enzimática. Os resultados desse estudo foram reinterpretados em termos de atividade de água por HALLING (1990), confirmando que a atividade enzimática ótima está relacionada com a atividade de água, independente do solvente usado. Este mesmo autor tem proposto que a atividade termodinâmica da água é um parâmetro que deve ser usado para quantificar o nível de água associado à enzima (HALLING, 1992). A água, dessa maneira, é requerida, unicamente, para a função catalítica das enzimas em solventes orgânicos, contribuindo para a formação de todas as ligações não covalentes e pontes de hidrogênio da estrutura proteica.

A quantidade de água necessária para a catálise depende das características de cada enzima. Lipases são altamente ativas quando poucas moléculas de água estão associadas com a molécula proteica (VALIVETY et al., 1992). Subtilisina e α -quimiotripsina necessitam menos de 50 moléculas de água por molécula de enzima para exibir sua atividade mínima. Álcool oxidase, álcool desidrogenase, e polifenoloxidase, entretanto, são unicamente ativas quando um elevado número de moléculas de água ($3,5 \times 10^7$) está ligado com a molécula de enzima formando uma monocamada (ZAKS; KLIBANOV, 1988).

Existe um consenso de que as enzimas são mais termoestáveis em meios com baixo conteúdo de água do que em soluções aquosas. Isto pode ser explicado pelo aumento da rigidez e pelos processos covalentes envolvidos na inativação irreversível, tais como

deamidação, hidrólise de peptídeos e decomposição de cistina, que necessitam de água. Estes processos são extremamente lentos em meios de baixa concentração de água. O aumento da termoestabilidade tem sido mostrado para a lipase do pâncreas de suínos, α -quimiotripsina, ribonuclease, lisozima e tirosinase (LIMA; ANGNES, 1999).

2.4.3 Influência do suporte de imobilização

O alto custo de lipases, a possibilidade de regeneração e reutilização da enzima é um atrativo atual na biocatálise. A imobilização pode proteger a enzima de uma provável desnaturação provocada pelo solvente. Isto ajuda na manutenção da homogeneidade de enzimas no meio reacional, evitando a formação de aglomerados de partículas de enzima (ZOUMPANIOTI et al., 2010). Adicionalmente a facilidade de manuseio, as enzimas imobilizadas são bem adequadas para serem usadas em reatores empacotados ou fluidizados. A imobilização de lipase é um tópico bastante discutido em vários artigos e livros textos (HANEFELD; GARDOSSI; MAGNER, 2009; ES; VIEIRA; AMARAL, 2015; CASTRO et al., 2008). Os trabalhos descritos na literatura tratam de diferentes técnicas de imobilização de lipases, caracterização dos complexos ativados e aplicações em reações que se processam em meios aquosos e não aquosos. Uma grande variedade de materiais naturais, sintéticos orgânicos ou inorgânicos, com diferentes características de tamanho, forma e densidade, são estudados para a imobilização de lipases e não será abordada detalhadamente.

Suportes com alta resistência mecânica são desejáveis particularmente em sistemas com agitação. A presença de solventes pode requerer suportes de materiais com alta resistência química. Os suportes permitem a utilização efetiva da enzima por ter moléculas de enzima acessíveis ao substrato. Considerando que a perda de atividade é uma questão de tempo, o suporte deve ser também facilmente regenerado com enzimas ativas. Suportes contribuem para a distribuição do substrato disponível a enzima em meio não aquoso. A presença de uma pequena quantidade de água permite a existência de íons de ácido carboxílico livre. Uma resina de troca iônica tende a atrair ácidos carboxílicos devido as suas cargas positivas, resultando em uma alta concentração de substrato disponível na enzima. Isto promove altas taxas de reações de esterificação observada com lipases imobilizadas em resinas de troca iônica (BLOOMER et al., 1990).

O aumento da estabilidade é verificado em algumas preparações de lipases quando imobilizadas, possivelmente devido a capacidade do suporte em reter a quantidade correta de água para enzima se manter ativa sem causar flexibilidade que proporciona a

desnaturação. GRAY et al. (1990), testaram vários suportes na imobilização da lipase *C. rugosa* e encontraram atividades, em muitos casos, muito mais elevada do que nas enzimas livres. A atividade da lipase imobilizada especialmente em suportes hidrofóbicos, tais como polietileno tem sido reportado ser mais alta do que na lipase livre. Isto foi explicado considerando o efeito de orientação dado pela estrutura do suporte, o que provavelmente forneceu a enzima melhor exposição ao substrato.

2.4.4 Estratégias para a remoção de água de sistemas reacionais

A recuperação de lipases para uso em processos semicontínuos ou contínuos geralmente envolve a secagem da enzima, entretanto uma secagem intensa pode desativar a enzima. Uma das maiores dificuldades na reação de esterificação catalisada por lipase é a remoção de água produzida no progresso da reação.

Peneiras moleculares ativadas ou sais hidratados, tal como sulfato de magnésio, podem ser adicionados ao sistema para remover a água produzida pela reação. Numa reação de esterificação catalisada por Lipozyme em heptano, CASTRO et al. (1992), testaram diferentes técnicas de remoção de água (por borbulhamento de ar, lavagem com acetona seguido por borbulhamento de ar ou pela adição de peneira molecular). Todas três estratégias resultaram em quantidades similares de remoção de água. Enquanto as peneiras moleculares reduziram a quantidade de água, a água formada durante a reação foi incorporada a enzima e teve pequeno efeito no produto de conversão. Decréscimos na conversão foram reportados quando o período de contato da peneira molecular com a enzima foi longo.

Na síntese de monooleína por esterificação enzimática do glicerol com ácido oleico, FREITAS et al. (2011) investigaram diferentes estratégias para remoção da água gerada durante as reações. O uso de peneiras moleculares foi utilizado como estratégia para remover a água formada e experimentos com diferentes estratégias foram realizadas: (1) reator de leito fixo com camadas de peneiras moleculares e lipase imobilizada e (2) três reatores em série acoplando uma coluna extratora de água entre dois leitos com lipases imobilizadas. O melhor desempenho foi obtido utilizando a coluna extratora de água proporcionando aumento 22 para 35% na formação de monooleína. Esta estratégia também favoreceu a manutenção estável de operação do reator em função do tempo de meia-vida do biocatalisador estimado em 19 dias.

2.5 Reatores enzimáticos

Reator ou biorreator pode ser definido como equipamento no qual as enzimas são colocadas em contato com a solução de substrato. Embora haja uma grande variedade de biorreatores, os mesmos princípios básicos são aplicados em todos os casos (ZANIN; MORAES, 2014).

Diversos são os tipos de reatores enzimáticos e cada um deles apresenta vantagens e desvantagens, não havendo um método teórico capaz de prever qual o melhor biorreator para um dado processo. A seleção do reator mais apropriado para um determinado bioprocessamento depende das características da bioconversão e de condições reacionais, cinéticas e ligadas ao biocatalisador, que vão determinar o modo de operação e as características do fluxo (COELHO; SALGADO; RIBEIRO, 2008). Podem abranger desde grandes colunas industriais com diversos metros cúbicos de capacidade, a pequenos eletrodos que incorporam microgramas de enzima. Embora haja essa amplitude de possíveis escalas os mesmos princípios básicos são aplicados em todos os casos (KENNEDY; CABRAL, 1983).

Os biorreatores podem ser classificados em reatores para sistemas particulados, reatores tipo placas e reatores lineares, podendo operar em modo batelada ou contínuo. Os reatores para sistemas particulados compreendem os tipos (Figura 2.7): tanque agitado em batelada (BSTR), tanque agitado contínuo (CSTR), membrana (MR), leito fixo (PBR) e leito fluidizado (FBR) (ZANIN; MOARES, 2014).

No reator de tanque agitado (STR), as partículas de biocatalisador são dispersas na solução de substrato, sendo a agitação promovida por agitadores mecânicos ou por agitadores orbitais. Nos reatores de leito fixo e fluidizado, o biocatalisador é mantido no interior do reator enquanto o fluido é passado através do leito. Estes são os tipos de reatores preferidos para as aplicações em larga escala (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Biorreatores de tanque agitado têm sido os mais comumente apresentados na literatura para estudos com lipases. Estes sistemas apresentam, entretanto, algumas desvantagens para uso em escala industrial, uma vez que os sistemas imobilizados não podem ser carregados em grande quantidade no reator e são susceptíveis à quebra devido às altas tensões de cisalhamento impostas pela agitação mecânica (ZANIN; MORAES, 2014). Apesar de sua flexibilidade, os biorreatores STB apresentam certas desvantagens, como: (i) grande demanda de energia, para agitação mecânica; (ii) tendem a afetar a

morfologia celular; (iii) difícil escalonamento, e tem de ser cuidadosamente projetados para produzir adequada mistura e agitação (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014). Deve-se destacar, também, que os reatores de tanque agitado (STR) podem ser operados em modo contínuo (CSTR) ou descontínuo (BSTR), apresentando, este último, a desvantagem da imposição de tempos mortos de operação, relativos à carga, descarga e limpeza do sistema (BALCÃO et al., 1996; ZANIN; MOARES, 2014).

Figura 2.7 - Exemplos de configurações de biorreatores utilizados na bioconversão de processos envolvendo enzimas livres ou imobilizadas. Reatores (a) leito fixo (PBR - Packed bed reactor), (b) leito fluidizado (FBR - Fluidized bed reactor), (c) batelada tanque agitado (BSTR - Batch stirred tank reactor), (d) contínuo tanque agitado (CSTR - Continuous stirred-tank reactor) e (e) Reator de Membrana (MR - Membrane Reactor).

Fonte: Adaptado de POPPE et al., 2015.

Uma opção normalmente usada em processos em escala industrial é o biorreator de leito empacotado. Embora em escala de laboratório os reatores STR sejam bastante comuns, o leito fixo ou empacotado tem sido tradicionalmente usado para a maioria dos reatores catalíticos em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo, facilidade de construção, operação, ampliação de escala, controle automático e menor grau de força de cisalhamento, consequentemente, evitando-se a ruptura das partículas do biocatalisador (AL-ZUHAIR et al., 2011; WANG et al., 2011). Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito, aparecimento de caminhos preferenciais e fluxos de calor e massa ineficientes (ZANIN; MORAES, 2014).

Outra opção que permitiria melhorar as características de mistura do sistema quando comparado ao leito fixo, evitando a formação de caminhos preferenciais, é o reator

de leito fluidizado. Sob o aspecto hidrodinâmico, este biorreator é um intermediário entre a mistura completa do CSTR ideal e o reator tubular do leito fixo ideal (BALCÃO et al., 1996). Neste sistema, a velocidade ascendente do fluido reacional é aumentada até atingir um ponto, no qual a queda de pressão no leito, torna-se equivalente ao peso deste por unidade de superfície, fazendo com que, as partículas percam o contato entre si e movimentem-se de maneira semelhante a um líquido em ebulição (leito fluidizado). Acima desta velocidade, há expansão do leito até que se atinja um valor máximo (velocidade máxima de fluidização), acima do qual as partículas são arrastadas para fora do reator (BARON; WILLAERT; BACKER, 1996).

2.5.1 Reatores de leito fixo

Esta configuração de biorreator consiste em uma coluna cilíndrica que suporta um leito empacotado de biocatalisador no qual os substratos entram ascendentemente /descendentemente e os produtos são recolhidos na outra extremidade do reator de forma contínua. Atenção especial deve ser dada às partículas sólidas do biocatalisador que precisam ter dimensões adequadas, a fim de controlar a queda de pressão através da passagem do fluxo de alimentação. O fluxo deve possuir velocidade baixa, o que aumenta o tempo de contato entre enzima e substrato e resulta em conversões elevadas (FERNANDES, 2010). O leito fixo de um reator não é homogêneo, mas a variação de concentração ao longo do leito pode ser diminuída por aumento da taxa de fluxo. Gradientes de pH podem ocorrer se a reação consome ou produz H^+ ou OH^- . Em função da mistura não ideal, o controle de pH por adição de ácido ou base é quase impossível. Leitos com maior volume de poros vazios permitem maiores velocidades de fluxo através deles, entretanto a concentração do biocatalisador em um dado volume do leito diminui à medida que a porosidade é aumentada. Se o leito do biocatalisador (suporte e biocatalisador) é compressível, seu peso pode comprimir o leito ao menos que a altura do leito seja pequena. É difícil o fluxo através de um leito fixo do reator com a porosidade reduzida. Reatores de leito fixo são amplamente utilizados em processos catalisados por enzimas imobilizadas (RATLEDGE; KRISTIANSEN, 2006).

O reator de leito fixo pode operar em fluxo contínuo ou descontínuo por meio da recirculação do substrato. O método de reciclagem é vantajoso, pois permite que a solução de substrato passe através da coluna na velocidade desejada. Para aplicações industriais, o fluxo ascendente do substrato é preferível ao fluxo descendente porque não comprime o

leito de enzima resultando em obstrução do leito, limitações difusionais e quedas de pressão (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Ele requer um mínimo de equipamentos auxiliares e é muito eficiente. Neste caso, as tensões de cisalhamento impostas ao sistema imobilizado são menores e um reator ideal deste tipo opera, ao contrário do STR, como um reator tubular. Isto, mesmo em reatores não ideais, resulta em altas taxas de conversão no reator. Algumas desvantagens para estes sistemas, entretanto, podem ser citadas, como a facilidade de obstrução do leito e aparecimento de caminhos preferências (FERNANDES, 2010; ZANIN; MORAIS, 2014). No entanto, essa configuração, pode ser mais influenciada por limitações de transferência de massa e calor, refletida, por exemplo, pela relação geométrica do reator (XU et al., 2000).

Diversos estudos relatados na literatura mencionam a implementação com sucesso dos reatores de leito empacotados na produção enzimática de ésteres usando diferentes configurações, conforme ilustrado na Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Visão geral de síntese de ésteres sintetizados por catálise enzimática em processo contínuo.

Lipase	Materiais de partida	Produto	Solvente	Razão molar álcool:ácido	Vazão (mL h ⁻¹)	Tempo espacial (h)	Duração (dias)	Conversão molar (%)	Referências
<i>Candida rugosa</i> imobilizada em microemulsão de organogéis	ácido valérico /etanol	Valereato de etila	Iso-octano	não reportado	não reportado	não reportado	13	95	KHAN; RATHOD (2015)
<i>Acinetobacter</i> sp. EH28	ácido caprílico /etanol	Caprilato de etila	Ciclo-hexano	não reportado	não reportado	não reportado	7	63	KHAN; RATHOD (2015)
Novozym 435®	ácido láurico /butanol	Laurato de butila	hexano	equimolar	0,06	2	não reportado	67	WOODCOCK et al. (2008)
Lipozyme IM™	ácido láurico /isopentanol	Laurato de isopentila	hexano	1:2	270	0,43	não reportado	97	CHANG et al. (2007)
Lipozyme IM™	ácido láurico /hexanol	Laurato de hexanila	isento	1:3	3,0	não reportado	não reportado	60	JU et al. (2008)
<i>P. camembertii</i> imobilizada em SiO ₂ -PVA	ácido oleico /glicerol	Monoglicerídeos (MAG) Diglicerídeos (DAG)	isento	8:1	1,1	14,1	9	35	FREITAS et al. (2011)
Novozym 435®	ácido oleico /álcool isoamílico	Oleato de isoamila	isento	6:5	não reportado	0,04	6	98	MADARÁSZ et al. (2015)

Fonte: Própria.

2.6 Utilização do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres

O óleo fúsel é a fração menos volátil obtida durante o processo de destilação do álcool combustível. Os principais componentes do óleo fúsel são o etanol (13%), butanol (15%), álcool isoamílico (51%) e pequenas proporções de outros alcoóis secundários e água (15%). Além dos compostos listados anteriormente, AZANIA et al. (2010) relatam que sec-butanol, ésteres, alcanos e terpenos podem também se fazer presentes. O óleo fúsel pode ainda conter os alcoóis hexílicos, heptílicos e octílicos em mínimas quantidades. Entretanto, o principal constituinte do óleo fúsel é o álcool isoamílico (AZANIA, 2007), que provém da decomposição de iso-leucina, aminoácido proveniente da hidrólise de proteínas da levedura (KÜÇÜK; CEYLAN, 1998).

No Brasil, o óleo fúsel é geralmente produzido na proporção de 2,5 L para cada 1000 L de etanol (FERREIRA et al, 2013). A produção brasileira de etanol (anidro e hidratado) em 2017 ultrapassou 28 bilhões de litros (ANP, 2018). Nesta escala, um total de 70 milhões de litros de óleo fúsel foi gerado na safra 2017/18. Os estudos sobre o aproveitamento do óleo fúsel têm sido direcionados sobre a obtenção do álcool isoamílico por destilação fracionada simples ou dupla, dependendo da qualidade do produto desejado (PÉREZ et al., 2001). A utilização do óleo fúsel como solvente é limitado e uma grande parte do óleo fúsel é geralmente descartada devido à sua cor escura avermelhada relativamente indesejável e com odor desagradável. No entanto, estudos tem sugerido que o óleo fúsel tem potencial como matéria-prima abundante e de baixo custo, como precursor de ésteres para indústria de alimentos e cosméticos, sendo esta alternativa bastante atrativa sob o ponto de vista técnico-econômico.

Nos trabalhos identificados na literatura foram empregados óleo fúsel proveniente da fermentação de milho (WELSH; WILLIAMS, 1989) e proveniente da fermentação de caldo de cana-de-açúcar, fornecido por destilarias situadas no Estado de São Paulo (MACEDO; PASTORE, 1997; DE CASTRO et al., 1999; CASTRO; MORIYA; RIBEIRO, 2000). Entre as unidades produtoras, as concentrações dos alcoóis constituintes do óleo fúsel variam, mas os alcoóis isoamílico, etílico e isobutílico sempre se apresentam em maior proporção (AZANIA et al., 2010).

Para se desenvolver um processo enzimático eficiente utilizando óleo fusel como precursor, o conhecimento da especificidade da lipase pelo substrato é fator importante (RAHMAN; CHAIBAKHSH; BASRI, 2011). Comportamentos diferenciados podem ser verificados na literatura, empregando diversas fontes de lipases, polaridade do grupo acila,

diferentes razões molares e tempo de reação. A esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois catalisada por lipase é uma estratégia comum para a acilação de alcoóis primários, enquanto ainda permanece uma tarefa complexa para alcoóis secundários. Neste caso específico, a seleção de um doador do grupo acila apropriado influencia a reatividade da enzima significativamente. Alguns exemplos são apresentados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 - Rendimento de éster relatado por vários autores obtidos pela esterificação do álcool isopentanol proveniente do óleo fúsel com diferentes ácidos carboxílicos com diversas enzimas na presença ou ausência de solventes.

Enzima	Solvente	Substrato	Conversão em Éster (%)	Tempo de reação (h)	Referência
Lipozyme TL IM	hexano	ácido butírico /isopentanol	93	18	ANSCHAU et al. (2011)
Novozym 435	isento	ácido acético /isopentanol	75	8	GUVENÇ et al. (2007)
Novozym 435	isento	ácido oleico /isopentanol	99,8	6	DORMO et al. (2004)
Lipozyme TL IM	heptano	ácido láurico /isopentanol	92	8	DE CASTRO et al. (1999)
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido propílico /isopentanol	72	24	MACEDO; PASTORE (1997)
<i>Candida cylindracea</i>	hexano	ácido butírico /isopentanol	65,8	48	WELSH; WILLIAMS (1989)

Fonte: Própria.

ANSCHAU et al. (2011) relataram produção máxima do éster butirato de isopentila sob condições de 30 °C, 180 rpm, razão molar álcool: ácido de 1:1, concentração de enzima 0,02 g.mL⁻¹ e concentração de ácido butírico de 0,5 mol.L⁻¹. Sob essas condições ótimas foi obtido 92% de esterificação e concentração de éster de 0,9 mol.L⁻¹. O álcool isoamílico obtido a partir de óleo fúsel foi utilizado nas mesmas condições resultando em 93% de esterificação e concentração de éster de 1,0 mol.L⁻¹.

GUVENÇ et al. (2007) reportaram resultados de conversão de 75% (3,40 mol.L⁻¹) em 8 h de reação catalisada pela lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym 435) em meio isento de solvente, e verificaram que variável mais significativa foi a razão molar ácido/álcool (0,2: 0,8). Ainda Welsh e Williams (1989) reportaram produção máxima de uma mistura de éster de ácido butírico (0,62 mol L⁻¹; rendimento = 65,8%) e éster de ácido acético (0,052 mol L⁻¹; rendimento = 46,4%) em 48 horas de reação utilizando a lipase *Candida cylindracea*. Desempenho superior foi obtido por CASTRO et al. (1999)

empregando um sistema reacional composto de ácido láurico e óleo fúsel e Lipozyme como biocatalisador obtendo resultados satisfatórios com rendimentos de 92% ao final de 8 horas de reação.

MACEDO; PASTORE (1997) testaram cinco lipases microbianas de *Geotrichum* sp, *Alcaligenes* sp, *Aspergillus* sp 1068, *Aspergillus* sp 1099 e *Rhizopus* sp, quanto à capacidade de catalisar a síntese de ésteres formadores de aroma por esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando óleo fúsel como precursor. A natureza da enzima, assim como o tamanho da cadeia dos ácidos afetaram as taxas de conversão obtidas. Os melhores resultados obtidos foram 88% de conversão na síntese de laurato de isoamila e 72% para propionato de isoamila pela lipase de *Rhizopus* sp após 24 h de incubação, seguido de 82% de conversão na síntese de acetato de isopropila por *Alcaligenes* sp após 24 h de incubação.

DORMO et al. (2004) construíram um sistema com pervaporação para ser utilizado na remoção da água produzida na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase Novozym 435. O sistema foi adequado para obter altas conversões em condições ideais (rendimento = 99,8 % em 6 h de reação).

2.7 Síntese enzimática de ésteres a partir de óleo fúsel com diferentes ácidos carboxílicos

Figura 2.8 – Esquema da síntese de ésteres por catálise enzimática a partir da matéria-prima residual óleo fúsel com ácidos carboxílicos de diferentes tamanhos de cadeia.

Fonte: Própria.

2.7.1 Caprilato de isoamila

Dentre os ésteres de ácidos graxos derivados do óleo fusel, os de baixa massa molecular representam uma importante classe de aromas (MARTINS et al., 2011; MACEDO; PASTORE, 1997). O aroma é um dos mais importantes atributos de alimentos, bebidas e cosméticos. Estima-se que aproximadamente 6400 voláteis naturais e 10000 compostos de fragrância sintéticos sejam conhecidos, sendo poucas centenas regularmente utilizadas em aromas e fragrâncias e cerca de 400 aromas químicos manufaturados em escala maior que uma tonelada por ano. No Brasil, as indústrias que produzem aromas e sabores chegaram a faturar mais de R\$ 1,5 bilhões em 2009, incluindo as pequenas unidades, que criam seus produtos de forma artesanal (ABIFRA, 2018). Aromas produzidos por biocatálise podem ser caracterizados como "naturais" ou "idênticos ao natural" e, portanto são preferidos pelo mercado consumidor (FELIPE; OLIVEIRA; BICAS, 2017). A presença de aromas adiciona valor ao produto, o que significa que o custo da biocatálise passa a ser menos significativo (DUBAL; TILKARI; BORKAR, 2008).

A esterificação do ácido caprílico com o álcool isoamílico produz o caprilato de isoamila um éster muito utilizado na indústria alimentícia que apresenta as seguintes características:

- Nome do produto: caprilato de isoamila;
- Nome químico: octanoato de isoamila;
- Fórmula empírica: $C_{13}H_{26}O_2$;
- Aparência: líquido incolor a amarelo claro;
- Odor: frutado;
- Ponto de ebulição: 267-268 °C;
- Densidade específica (20 °C): 0,855 - 0,865 g mL⁻¹;
- Índice de refração (20 °C): 1,424 - 1,434;
- Solubilidade: insolúvel em água; solúvel na maioria dos solventes orgânicos.

2.7.2 Laurato de isoamila

O laurato de isoamila é um éster de ácido graxo com propriedades emolientes utilizado em formulações de produtos cosméticos para melhorar a espalhabilidade do produto (MAC-MARY et al., 2006). Os ésteres emolientes derivados de ácidos graxos de cadeia longa cada vez mais substituem os óleos simples (por exemplo, óleo mineral ou vaselina) como fase oleosa em emulsões cosméticas, devido sua capacidade de manter a pele suave e macia (ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013).

Os ésteres emolientes são o segundo componente principal após a água em emulsões cosméticas. O termo "emoliente" é frequentemente usado e significa "amaciante". A composição química dos ésteres emolientes pode ser amplamente variada para se adequar a uma variedade de propriedades, o que torna essa classe de compostos muito versátil. São na sua maioria feitos de cadeia linear ou ramificada, ácidos graxos saturados ou insaturados. Suas propriedades podem ser diferenciadas em propriedades básicas - viscosidade, tensão superficial, espalhabilidade, polaridade e ponto de fluidez (HILLS, 2003).

A esterificação do ácido láurico com o álcool isoamílico produz o laurato de isoamila um éster muito utilizado na indústria de cosméticos que apresenta as seguintes características:

- Nome do produto: laurato de isoamila;
- Aparência (20 °C): líquido;
- Cor: incolor;
- Odor: fraco a inodoro;
- Densidade (20 °C): 0,850 - 0,890 kg L⁻¹;
- Viscosidade (40 °C): 3,9 mm² s⁻¹;
- Ponto de ebulição: 298 °C.

2.7.3 Oleato de isoamila

Ésteres de ácidos graxos com 22 a 26 átomos de carbono, incluindo o oleato de isoamila (23 átomos de carbono), têm sido utilizados como plastificantes e compostos lubrificantes para diferentes aplicações industriais e automotivas. Estes ésteres apresentam alta biodegradabilidade e baixa toxicidade, apresentando excelente combinação de propriedades ecológicas (LAGE et al., 2016). Além disso, a presença do grupo éster em

lubrificantes confere fluidez à baixa temperatura e reduz volatilidade a altas temperaturas. Ele também fornece uma afinidade para superfícies metálicas (SALIMON et al., 2014).

Os lubrificantes, de uma forma geral, devem apresentar certas propriedades físico-químicas dentro de determinadas especificações, como por exemplo: viscosidade, índice de acidez, corrosividade, ponto de fluidez, etc. No caso dos biolubrificantes, geralmente constituídos por ésteres orgânicos, as estabilidades oxidativa, térmica e hidrolítica são essenciais, sendo a primeira uma das propriedades mais importantes no desenvolvimento de um lubrificante biodegradável (KOLWZAN; GRYGLEWICZ, 2003).

A esterificação do ácido oleico com o álcool isoamílico produz o oleato de isoamila um éster com propriedades lubrificantes e que apresenta as seguintes características:

- Nome do produto: oleato de isoamila;
- Aparência (20 °C): líquido;
- Cor: incolor;
- Odor: característico;
- Densidade (20 °C): 0,864 – 0,925 g cm⁻³;
- Viscosidade (40 °C): 6,39 – 9,03 mm² s⁻¹;
- Viscosidade (100 °C): 2,28 – 2,70 mm² s⁻¹;
- Ponto de ebulição: > 150 °C;
- Ponto de fulgor: 55 °C

REFERÊNCIAS

- ABIFRA. Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Essenciais, Produtos Químicos Aromáticos, Fragrâncias, Aromas e Afins. <<http://www.abifra.org.br/wp/>>. Acesso em 30 Mai. 2018.
- ÁGUIAR, C. L.; MOREIRA, M. R. V.; CASTRO, H. F. Lipase catalyzed alcoholysis of citronellyl butyrate to produce citronellol. **Ciência y Tecnología Alimentaria**, v. 3, p. 134-139, 2001.
- AL-ZUHAIR, S.; ALMENHALI, A.; HAMAD, I.; ALSHEHHI, M.; ALSUWAIDI, N.; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of a pilot plant. **Renewable Energy**, v. 36, n. 10, p. 2605-2614, 2011.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE, A. Microbial lipases and their industrial applications: review. **Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 100-118, 2012.
- ANOBOM, C. D.; PINHEIRO, A. S.; DE-ANDRADE, R. A.; AGUIEIRAS, E. C.; ANDRADE, G. C.; MOURA, M. V.; FREIRE, D. M. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br>>. Acesso em: 10.07.2018.
- ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A.; BURKERT, J. F. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2148-2156, 2011.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475-6490, 2013.
- AZANIA, A. A. P. M. **Potencialidade herbicídica do óleo fúsel**, 2007. p.93. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2007.
- AZANIA, C. A. M.; AZANIA, A. A. P. M.; ROLIM, J. C.; SCHIAVETTO, A. R.; PIZZO, I. V.; ZERA, F. S. Aplicação de óleo fúsel na erradicação química da cana-de-açúcar e seu efeito na cultura do girassol em sucessão. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 581-590, 2010.
- BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: state of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 6, p. 392-416, 1996.
- BARON, G. V.; WILLAERT, R. G.; BACKER, L. Immobilised cell reactors. In: BARON, G. V., WILLAERT, R. G., BACKER. **Immobilised living cell systems: modeling and experimental methods**. Chichester: John Wiley, 1996. p. 67-95.
- BARRIUSO, J.; VAQUERO, M. E.; PRIETO, A.; MARTÍNEZ, M. J. Structural traits and catalytic versatility of the lipases from the *Candida rugosa*-like family: a review. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 874-885, 2016.

- BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A. P.; KHEDY, G. I.; DELL DUCAS, J.; CUSTODIO, A. P.; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.
- BASTIDA, A.; SABUGUILLO, P.; ARMISEN, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HUGUET, J.; GUISAN, J. M. Single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 58, n. 5, p. 486-493, 1998.
- BELLOT, J. C.; CHOISNARD, L.; CASTILLO, E.; MARTY, A. Combining solvent engineering and thermodynamic modeling to enhance selectivity during monoglyceride synthesis by lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, n. 4-5, p. 362-369, 2001.
- BEN SALAH, R.; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368-372, 2007.
- BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIC, S.; KNEZEVIC, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 97-101, 2007.
- BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M.; ALVARENGA, N.; SANTOS, D. D. A.; MATOS, I. L.; COMASSETO, J. V.; PORTO, A. L. Biocatalysis and biotransformation in Brazil: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 481-510, 2015.
- BLOOMER, S.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Triglyceride interesterification by lipases. 1. Cocoa butter equivalents from a fraction of palm oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 8, p. 519-524, 1990.
- BRINK, L. E. S.; LUYBEN, K. C. A. M.; VANT RIET, K. Biocatalysis in organic media, **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 10, n. 12, p. 736-743, 1988.
- BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; MELO, E. H. M.; CASTRO, H. F. Ester synthesis by *Mucor miehei*. Lipase immobilized on magnetic polysiloxane-polyvinyl alcohol particles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 113, I-3, p. 189-200, 2004.
- CALAM, A.; SOLMAZ, H.; UYUMAZ, A.; POLAT, S.; YILMAZ, E.; IÇINGUR, Y. Investigation of usability of the fusel oil in a single cylinder spark ignition engine. **Journal of the Energy Institute**, v. 88, n. 3, p. 258-265, 2015.
- CARTA, G.; GAINER, J. L.; BENTON, A. H. Enzymatic synthesis of esters using an immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 1004-1009, 1992.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A.; LEGGE, R. L.; MOO-YOUNG, M. Process development for the production of terpene esters using immobilized lipase in organic media. **Indian Journal of Chemistry -Section A**, v. 31, p. 891-895, 1992.

CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C.; AGUIAR, C. L. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n.1, p.146-156, 2004.

CASTRO, H. F., MORIYA, R. Y., OLIVEIRA, P. C., SOARES, C. M. F. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77/79, p. 827-826, 1999.

CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; RIBEIRO, R. R. Biotransformação de óleo fúsel em ésteres aromatizantes: influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. In: SIMPÓSIO IBERO-AMERICANO DE CATÁLISE, 17, 2000, Porto. FEUP Edições, 2000. v. 1. p. 793-794.

CASTRO, H. F., OLIVEIRA, P. C., SOARES, C. M. F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 237-241, 1997a.

CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Síntese de ésteres terpenóides por via enzimática: Influência do tamanho da cadeia alifática do ácido graxo e da estrutura do álcool de terpeno. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 17, n. 3, p. 224-228, 1997b.

CASTRO, H. F.; ZANIN, G. M.; MORAES, F. F.; PEREIRA, P. S. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E.P.S; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. **Enzimas em biotecnologia**: produção, aplicações e mercado. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123-147.

CHANG, S; SHAW, J; CHENG-KANG, Y; SHIEH, C. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, p. 1362-1366, 2007.

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.

COELHO, M. A. Z.; SALGADO, A. M.; RIBEIRO, B. D. **Tecnologia enzimática**. Petrópolis, RJ: EPUB, 2008. p. 72.

DAIHA, K. G.; ANGELI, R.; OLIVEIRA, S. D.; ALMEIDA, R. V. Are lipases still important biocatalysts? a study of scientific publications and patents for technological forecasting. **PloS one**, v.10, n. 6, p. e0131624, 2015.

DHAKE, K. P.; DESHMUKH, K. M.; PATIL, Y. P.; SINGHAL, R. S.; BHANAGE, B. M. Improved activity and stability of *Rhizopus oryzae* lipase via immobilization for citronellol ester synthesis in supercritical carbon dioxide. **Journal of Biotechnology**, v. 156, n. 1, p. 46-51, 2011.

DHAKE, K. P.; THAKARE, D. D.; BHANAGE, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 28, p. 71-83, 2013.

DORMO, N.; BELAFI-BAKO, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic

esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, p. 229-234, 2004.

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

DUBAL, S. A.; TILKARI, Y. P.; BORKAR, I. V. Biotechnological routes in flavour industries. **Advanced Biotechnology**, v. 3, p. 20-21, 2008.

ES, I.; VIEIRA, J. D. G.; AMARAL, A. C. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99, p. 2065-2082, 2015.

FABER, K. (ed.) In: **Biotransformations in Organic Chemistry: a Textbook**, 6rd ed., Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 2011, 436p.

FELIPE, L. O.; OLIVEIRA, A. M.; BICAS, J. L. Bioaromas e perspectives for sustainable development. **Trends in Food Science & Technology**, v. 62, p. 141-153, 2017.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. **Enzyme Research**, v. 2010, p. 1-19, 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERREIRA, M.C.; MEIRELLES, A.J.A.; BATISTA, E.A.C. Study of the fusel oil distillation process. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 6, p. 2336-2351, 2013.

FINDRIK, Z.; NÉMETH, G.; VASIC-RACKI, Đ.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; CSANÁDI, Z.; GUBICZA, L. Pervaporation-aided enzymatic esterifications in non-conventional media. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 12, p. 1715-1722, 2012.

FREITAS, L.; SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research & Technology**, v. 233, p. 743-750, 2011.

GANDHI, N. N.; PATIL N. S.; SAWANT S. B.; JOSHI J. B. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis Reviews**, v. 42, n. 4, p. 439-480, 2000.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, J.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty acid esters. Part I kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 584-90, 1999.

GORMAN, L.A.S.; DORDICK, J.S. Organic solvents strip water off enzymes. **Biotechnology and Bioengineering**, v.39, n.4, p.392-397, 1992.

GOTO, M.; HATANAKA, C.; GOTO, M. Immobilization of surfactant-lipase complexes and their high heat resistance in organic media. **Biochemical Engineering Journal**, v. 24, p. 91-94, 2005.

GRAY, C. J.; NARANG, J. S.; BARKER, S. A. Immobilization of lipase from *Candida cylindraceae* and its use in the synthesis of menthol esters by transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 10, p. 800-807, 1990.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOGAN, O.; MEHMETOGLU, U. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 778-785, 2007.

HALDANE, J. B. S. Enzymes. London: Longman; Green & Co. Cambridge, Mass.: The MIT Press: Longmans, Green & Co, 1930.

HALLING, P. J. Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. **Biotechnology Techniques**, v. 6, n. 3, p. 271-276, 1992.

HALLING, P. J. Solvent selection for biocatalysis in mainly organic systems: predictions of effects on equilibrium position. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, n. 7, p. 691-701, 1990.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 453-468, 2009.

HERBST, D.; PEPPER, S.; NIEMEYER, B. Enzyme catalysis in organic solvents: influence of water content, solvent composition and temperature on *Candida rugosa* lipase catalyzed transesterification. **Journal of Biotechnology**, v. 162, n. 4, p. 398-403, 2012.

HILLS, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 10, p. 601-607, 2003.

HOU, C. T.; SHIMADA, Y. Lipases. **Applied Microbiology: Industrial**. p. 385-392. 2009.

HUTCHEON, G. A.; HALLING, P. J.; MOORE, B. D. Measurement and control of hydration in nonaqueous biocatalysis. In: **Methods in Enzymology**. Academic Press, 1997. p. 465-472.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization—aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1019-1032, 2008.

JAEGGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JANSSENS, L.; POOTER, H. L.; SCHAMP, N. M.; VANDAMME, E. J. Production of flavours by microorganisms. **Process Biochemistry**, v. 27, n. 4, p. 195-215, 1992.

- JU, H. Y.; YANG, C. K.; YEN, Y. H.; SHIEH, C. J. Continuous lipase-catalyzed synthesis of hexyl laurate in a packed-bed reactor: optimization of the reaction conditions in a solvent-free system. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 29-33, 2009.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.
- KASCHE, V.; MICHAELIS, G.; GALUNSKY, B. Binding of organic solvent molecules influences the P1'-P2' stereo- and sequence-specificity of α -chymotrypsin in kinetically controlled peptide synthesis. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 2, p. 75-80, 1991.
- KAZLAUSKAS, R. J.; BORNSCHEUER, U. T. Biotransformations with lipases. **Biotechnology: Biotransformations I**, v. 8, p. 36-191, 1998.
- KENNEDY, J. F.; CABRAL, J. M. S. Immobilized Enzymes. In: **Solid phase biochemistry - analytical and synthetic aspects**. New York: John Wiley, 1983.
- KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793-1806, 2015.
- KOLWZAN, B.; GRYGLEWICZ, S. Synthesis and biodegradability of some adipic and sebacic esters. **Journal of Synthetic Lubrication**, v. 20, n. 2, p. 100-107, 2003.
- KRISHNA, S.H.; KARANTH, N.G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. In: DEKKER, M. **Catalysis Reviews**. New York: Madson Avenue, 2002. p. 499-591.
- KÜÇÜK, Z.; CEYLAN, K. Potential utilization of fusel oil: a kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction. **Turkish Journal of Chemistry**, v. 22, p. 289-300, 1998.
- KUMAR, A.; DHAR, K.; KANWAR, S. S.; ARORA, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures online**, v. 18, n. 1, p. 2, 2016.
- KUPERKAR, V. V.; LADE, V. G.; PRAKASH, A.; RATHOD, V. K. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-149, 2014.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n. 1, p. 81-87, 1987.
- LAGE, F. A. P.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H. H.; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-57, 2016.
- LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, v. 22, n. 2, p. 229-245, 1999.

LONGO, M.A.; SANROMÁN, M.A. Production of food aroma compounds: Microbial and enzymatic methodologies. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 335-353, 2006.

LORTIE, R. Enzyme catalyzed esterification. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 1997.

MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 115-119, 1997.

MAC-MARY, S.; CREIDI, P.; MARSAUT, D.; COURDEROT-MASUYER, C.; COCHET, V.; GHARBI, T.; GUIDICELLI-ARRANZ, D.; TONDU, F.; HUMBERT, P. Assessment of effects of an additional dietary natural mineral water uptake on skin hydration in healthy subjects by dynamic barrier function measurements and clinic scoring. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 3, p. 199-205, 2006.

MACRAE, A. R.; HAMMOND, R. C. Present and future applications of lipases. **Biotechnology Genetic Engineering**, v. 3, p. 193-219, 1983.

MADARASZ, J.; NEMETH, D.; BAKOS, J.; GUBICZA, L.; BAKONYI, P. Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor. **Journal of Cleaner Production**, v. 93, p. 140-144, 2015.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S.G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A.Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2311–2316, 2011.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Properties and biotechnological applications of porcine pancreatic lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 119-134, 2012.

NAKAOKI, T.; MEI, Y.; MILLER, L. M.; KUMAR, A.; KALRA, B.; MILLER, M. E.; KIRK, O.; CHRISTENSEN, M.; GROSS, R. A. *Candida antartica* lipase B catalyzed polymerization of lactones: effects of immobilization matrices on polymerization kinetics & molecular weight. **Industrial Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 126-134, 2005.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **Europe Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, p. 692-700, 2008.

NOVO NORDISK BIOINDUSTRIALS GROUP. A Ação das Enzimas, Catálogo Informativo, p. 47, 1995.

PALOMO, J. M.; FILICE, M. New emerging biocatalysts design in biotransformations. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 605-613, 2015.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, p. 187–204, 2000.

PÉREZ, E. R.; CARDOSO, D. R.; FRANCO, D. W. Análise dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 10-12, 2001.

POPPE, J. K.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 5, p. 511-525, 2015.

RAHMAN, M. B. A.; CHAIBAKHSH, N.; BASRI, M. Effect of alcohol structure on the optimum condition for Novozym 435-catalyzed synthesis of adipate esters. **Biotechnology Research International**, p. 1-7, 2011.

RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. (eds.). **Basic biotechnology**, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, 2006.

RESLOW, M.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. The influence of water on protease-catalyzed peptide synthesis in acetonitrile/water mixtures. **European Journal of Biochemistry**, v. 177, n. 2, p. 313-318, 1988.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 15-32, 2010.

RODRIGUEZ-NOGALES, J.M.; ROURA, E.; CONTRERAS, E. Biosynthesis of ethyl butyrate using immobilized lipase: a statistical approach. **Process Biochemistry**, v. 40, n. 1, p. 63-68, 2005.

ROSS, N.W.; SCHNEIDER, H. Activities of *Candida rugosa* lipase and other esterolytic enzymes coated on glass beads and suspended in substrate and water vapor: Enzymes in thin liquid films. **Enzyme and Microbial Technology**, v.13, n.5, p.370-377, 1991.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M.; YUSOP, R. M.; SALIH, N. Synthesis, reactivity and application studies for different biolubricants. **Chemistry Central Journal**, v. 8, n. 16, 2014.

SCHMID, A.; DORDICK, J. S.; HAUER, B.; KIERNERS, A.; WUBBOLTS, M. Industrial biocatalysis: today and tomorrow. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 68-258, 2001.

SCHMID, R. D.; VERGER, R. Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. **Angewandte Chemie-International Edition**, v. 37, n. 12, p. 1609-1633, 1998.

STEPANKOVA, V.; BIDMANOVA, S.; KOUDELAKOVA, T.; PROKOP, Z.; CHALOUPKOVA, R.; DAMBORSKY, J. Strategies for stabilization of enzymes in organic solvents. **ACS Catalysis**, v. 3, n. 12, p. 2823-2836, 2013.

STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; HATZILOUKAS, E.; AFENDRA, A. M.; PANDEY, A.; PAPAMICHAEL, E. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

SUMBY, K. M.; GRBIN, P. R.; JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. **Food Chemistry**, v. 121, n. 1, p. 1-16, 2010.

VALIVETY, R. H.; HALLING, P. J.; MACRAE, A. R. Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v. 1118, n. 3, p. 218-222, 1992.

VERGER, R. Interfacial activation of lipases: facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32-38, 1997.

WANG, X.; LIU, X.; ZHAO, C.; DING, Y.; XU, P. Biodiesel production in packed-bed reactors using lipase–nanoparticle biocomposite. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 10, p. 6352-6355, 2011.

WELSH, F. H., MURRAY, W. D., WILLIAMS, R. E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 6, p.1565-1568, 1989.

WOODCOK, L. L.; WILES, C.; GREENWAY, G. M.; WATTS, P.; WELLS, A.; EYLEY, S. Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using Novozym 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n.6, p. 466-472, 2008.

XU, X.; FOMUSO, L. B.; AKOH, C. C. Synthesis of structured triacylglycerols by lipase-catalyzed acidolysis in a packed bed bioreactor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 3-10, 2000.

YANG, Z.; ROBB, D. A. Partition coefficients of substrates and products and solvent selection for biocatalysis under nearly anhydrous conditions. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, n. 5, p. 365-370, 1994.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017-8021, 1988.

ZANIN, G. M.; MORAES, F. F. Enzimas imobilizadas. In SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. Cap. 4. p. 35-85.

ZOUMPANIOTI, M.; STAMATIS, H.; XENAKIS, A. Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization. **Biotechnology Advances**, v. 28, n. 3, p. 395-406, 2010.

CAPÍTULO 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Lipases

Foram utilizadas preparações de lipases comerciais de origem microbiana de diferentes fontes, como *Candida rugosa* (LCR, Tipo VII); *Pseudomonas fluorescens* (LAK); *Burkholderia cepacia* (LBC) e *Penicillium camembertii* (LG) adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical (St. Loius, MO, EUA). A lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) foi adquirida da Biocatalysts (Cardiff, Reino Unido). As enzimas adquiridas na forma livre foram posteriormente imobilizadas em suportes adequados, dependendo do objetivo do experimento. As principais características e atividade hidrolítica de cada enzima utilizada neste trabalho são descritas no Apêndice A.

3.1.2 Suporte de imobilização

No desenvolvimento do projeto foram utilizados suportes não comerciais e comerciais para imobilização das lipases. Dois suportes não comerciais de polissiloxano- β -ciclodextrina (SiO_2 - β CD) e polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) foram sintetizados pela técnica sol-gel, conforme metodologia descrita por Martin et al., 2018. A resina polimérica comercial Diaion HP-20 sintetizada a partir de copolímero de poliestireno/divinilbenzeno foi adquirida da Aldrich (98%, Sigma-Aldrich Chemical, St. Loius, MO, EUA). As características texturais destes suportes são apresentadas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Área superficial específica, volume de poros e diâmetro médio de poro para os suportes de SiO_2 - β CD, SiO_2 -HEC e Diaion HP-20.

Matriz	Área superficial específica ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Volume específico dos poros ($\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$)	Diâmetro médio dos poros ($\text{\AA}$)
SiO_2 - β CD ^a	462,35 $\pm$ 10,85	0,36 $\pm$ 0,02	31,13 $\pm$ 1,35
SiO_2 -HEC ^a	500,50 $\pm$ 14,21	0,35 $\pm$ 0,03	28,72 $\pm$ 1,46
Diaion HP-20 ^b	590,00	1,3	290,00

^aMartin et al., 2018.

^bFabricante Product Diaion HP20, 2018.

3.1.3 Materiais de partida

Como materiais de partida foram utilizados: ácido caprílico (98%) e ácido oleico (99%) adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA), ácido láurico (98%), e isooctano (99,5%) obtidos da Cromoline Química Fina, álcool isoamílico (min 99,5%, Merck). Óleo fúsel foi gentilmente fornecido pela destilaria (São Martinho S/A - Unidade Iracema, localizada em Iracemápolis - São Paulo) com composição aproximada de 64,98% de álcool isoamílico, 7,86% de álcool isobutílico, 0,38% de álcool *n*-butílico, 1,27% de álcool *n*-propílico e 9,22% de álcool etílico e 14,76% de água (Apêndice B).

3.1.4 Outros reagentes

Os outros reagentes utilizados foram: β -ciclodextrina (β CD, 97%), hidroxietilcelulose (HEC, 97%), tetraetilortossilicato (TEOS), epícloridrina (99%), adquiridos da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA), ácido clorídrico (min. 36%, Isotar), álcool etílico (95%), hidróxido de potássio (min. 85%) e hexano adquiridos da Cromoline (São Paulo), hexanol e octanol (Merck), heptano, polietilenoglicol – PEG-1.500 e goma arábica em pó pura (Synth). Azeite de oliva com baixa acidez (Carbonell, adquirido em mercado local). Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

3.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: Cromatógrafo a gás modelo GC-3800 (Varian, Estados Unidos) para dosagens dos álcoois consumidos e ésteres formados, RMN 300MHz modelo Mercury (Varian) para caracterização dos produtos formados e padrões cromatográficos, Nariz eletrônico modelo Cyranose 320TM, marca Smiths Detection, fabricado por Cyranosciences INC (EUA), viscosímetro (Modelo LVDVIIIICP-CP 520, Brookfield), titulador automático Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000). Outros equipamentos para procedimentos rotineiros, tais como: balança analítica acoplado com lâmpada de IV Modelo ID 50 (Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda), potenciômetro modelo mPA-210 (Spencer), placa provida de agitação magnética e temperatura controladas modelo 752A (Fisatom, Brasil).

3.3 Metodologia experimental

3.3.1 Síntese química dos padrões cromatográficos (caprilato de butila, caprilato de isoamila, laurato de isoamila e oleato de isoamila) empregando SOCl_2

A Figura 3.1 apresenta o fluxograma referente ao procedimento experimental adotado nas sínteses dos padrões cromatográficos (caprilato de butila, caprilato de isoamila, laurato de isoamila e oleato de isoamila).

Figura 3.1 - Fluxograma referente ao procedimento experimental adotado nas sínteses dos padrões cromatográficos.

Fonte: Própria.

As sínteses foram conduzidas em balão de fundo redondo de 125 mL contendo 5g de ácido carboxílico (ácido caprílico, ácido láurico ou ácido oleico) e 1,1 equivalente-grama de SOCl_2 por 3h sob agitação magnética de 150 rpm a 25 °C. O SOCl_2 residual foi removido por evaporação a vácuo e em seguida, foram adicionados ao meio 5,0 equivalente-grama do álcool (butanol ou isoamílico). A esterificação foi efetuada sob agitação magnética de 150 rpm a 25 °C por 3h. O HCl formado durante a reação e o álcool residual foram removidos do meio reacional por evaporação a vácuo. Os ésteres foram purificados por destilação a vácuo sob pressão reduzida e suas estruturas químicas confirmadas por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN^1H) (Apêndice C).

3.3.2 Tratamento do óleo fúsel

O elevado teor de água originalmente presente no óleo fúsel foi reduzido inicialmente por destilação fracionada, seguido de técnicas de desidratação com sais inorgânicos e peneiras moleculares de 3Å (Silicato de sódio e alumínio) (DE CASTRO et al., 1999). A concentração de água presente no óleo fúsel foi medida em titulador automático Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000).

3.3.3 Imobilização das lipases nos suportes híbridos

Os suportes híbridos de polissiloxano- β -ciclodextrina (SiO_2 - β CD) e polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) foram ativados com epicloridrina e em seguida embebidos em hexano numa relação sólido: líquido de 1:10 e mantido sob agitação branda por 2 h. Após este período, para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 250 mg de lipase na sua forma livre, empregando como agente estabilizante da enzima 100 μL de solução aquosa contendo 5 mg mL^{-1} de polietilenoglicol (massa molecular 1500). As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob agitação a 30 °C por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com hexano para remoção do excesso de umidade. Em seguida, os derivados foram acondicionados em dessecador sob vácuo para redução da umidade em valores inferiores a 5%.

3.3.4 Imobilização da lipase no suporte polimérico

10 g de suporte polimérico Diaion HP-20 foram inicialmente embebidos com 50 mL de solução de etanol (95% m/m) sob condições estáticas por 18 h em temperatura ambiente. Em seguida, o suporte foi filtrado em um funil de Buchner sob vácuo e cuidadosamente lavado com água destilada para remoção da solução residual de etanol. O suporte úmido (10 g) foi então incubado em 190 mL de fosfato de sódio 5 mM pH 7,0 contendo 250 mg de lipase/g de suporte. As suspensões foram mantidas sob agitação (200 rpm) em um agitador orbital à temperatura ambiente por 12 h. Os biocatalisadores preparados foram então filtrados sob vácuo, lavado com água destilada e armazenado a 4 °C por 24 h antes do uso.

3.3.5 Síntese dos ésteres em regime descontínuo

As reações de esterificação do álcool isoamílico e óleo fusel com os ácidos caprílico, láurico e oleico foram efetuados em reatores de tanque agitado operando em regime descontínuo usando o sistema descrito na Figura 3.2.

Figura 3.2 – Esquema da reação de esterificação do álcool isoamílico com ácido carboxílico.

Fonte: Própria.

As condições das reações são resumidas na Tabela 3.2 com relação ao tipo de biocatalisador usado, bem como razão molar entre álcool e os diferentes ácidos. As misturas álcool e ácido na presença ou ausência de solventes foram incubadas com as

diferentes preparações de lipase imobilizada com carregamento catalítico de 350 unidades de atividade por grama de meio reacional, por um período máximo de 72 h, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 40 a 50 °C. Amostras foram retiradas em intervalos periódicos para quantificação do consumo dos materiais de partida e formação do produto por cromatografia de fase gasosa.

Tabela 3.2 - Álcoois, razões molares e biocatalisadores testados nas reações de síntese de ésteres de ácidos carboxílicos em regime descontínuo.

Fonte de álcool	Ácido carboxílico	Biocatalisador	Razão molar álcool: ácido	Objetivo	Descrição dos resultados
Isoamílico	Caprílico	LCR ³ , LAK ¹ , LBC ² , LRO ⁵ , LG ⁴ imobilizada em SiO ₂ -βCD	Equimolar	Selecionar a lipase mais efetiva na síntese do caprilato de isoamila	Capítulo 4
Óleo fúsel	Caprílico	LRO ⁵ imobilizada em SiO ₂ -βCD	1:0,5 a 1:1,5	Determinar as condições otimizadas da síntese do caprilato de isoamila	Capítulo 4
Isoamílico	Láurico	LCR ³ , LAK ¹ , LBC ² , LRO ⁵ , LG ⁴ imobilizada em SiO ₂ -HEC	Equimolar	Selecionar a lipase mais efetiva para síntese do laurato de isoamila	Capítulo 5
Óleo fúsel	Láurico	LRO ⁵ imobilizada em SiO ₂ -HEC	1:1,5	Determinar o desempenho do biocatalisador utilizando óleo fúsel	Capítulo 5
Óleo fúsel	Oleico	LRO ⁵ imobilizada em Diaion HP-20	1:1,5	Determinar o desempenho do biocatalisador utilizando óleo fúsel	Capítulo 6

¹Lipase de *Pseudomonas fluorescens*; ²Lipase de *Burkholderia cepacia*; ³Lipase de *Candida rugosa*

⁴Lipase de *Penicillium camembertii*; ⁵Lipase de *Rhizopus oryzae*

Fonte: Própria.

3.3.6 Delineamento experimental

A influência das variáveis: razão molar (X_1) e temperatura (X_2) no rendimento de esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico empregando a preparação de lipase imobilizada em matriz híbrida de SiO_2 - β CD selecionada anteriormente (*Rhizopus oryzae*) foi determinada por um planejamento composto de face centrada 2^2 e pontos centrais, cujas variáveis codificadas estão apresentadas na Tabela 3.3. As esterificações foram conduzidas em reatores fechados de 50 mL contendo 20 mL de substrato contendo óleo fúsel previamente desidratado e ácido caprílico, sem adição de solventes nas razões molares entre álcool/ácido de 1:0,5 a 1:1,5 (a proporção de óleo fúsel adicionado foi calculada com base na concentração de álcool isoamílico presente neste resíduo). As misturas foram incubadas com a preparação de lipase imobilizada, com carregamento catalítico de 350 unidades de atividade por grama de meio reacional, por um período máximo de 48 h, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 40 a 50 °C. Amostras foram retiradas em intervalos periódicos para quantificação do consumo do álcool e concentração dos ésteres formados por cromatografia de fase gasosa. O consumo do ácido carboxílico foi quantificado por titulação volumétrica.

Tabela 3.3 - Valores reais e codificados das variáveis independentes usadas no planejamento fatorial 2^2 com face centrada.

Variáveis independentes	Níveis codificados		
	-1	0	+1
X_1 – Razão molar álcool/ácido	1:0,5	1:1	1:1,5
X_2 – Temperatura °C	40	45	50

Fonte: Própria.

Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica. Como variável resposta foi considerada o grau de esterificação, expresso em percentual molar do álcool isoamílico. A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statistica 13.

3.3.7 Síntese de ésteres em regime contínuo

As reações em regime contínuo foram efetuadas em reator de leito fixo de um estágio ou dois estágios usando os sistemas ilustrados nas Figuras 3.3 e 3.4, testando as condições apresentadas na Tabela 3.4. Cada coluna apresentava dimensões fixas (diâmetro = 15 mm, comprimento = 55 mm e volume = 10 mL) e o carregamento das lipases

imobilizadas foi ajustado em 80% do leito catalítico. Todos os experimentos foram efetuados a 45 °C com tempo espacial variável dependendo do objetivo. O progresso das reações de esterificação foi monitorado pelo recolhimento de amostras na saída do reator e o consumo do álcool isoamílico e formação dos ésteres foram determinados por cromatografia gasosa. O consumo dos ácidos carboxílicos foi determinado pela titulação com KOH 0,05 mol L⁻¹ e fenolftaleína como indicador, e o teor de água formada determinado em titulador Karl Fischer.

No sistema reacional óleo fúsel e ácido láurico a lipase de *R. oryzae* foi imobilizada em matrizes com diferentes polaridades: sílica híbrida hidroxietilcelulose (SiO₂-HEC) e resina Diaion HP-20 visando determinar o comportamento da água formada como subproduto no leito catalítico. O meio de alimentação era constituído por óleo de fusel e ácido láurico na razão molar de 1:1,5 na presença de isooctano. O teor de água no substrato foi mantido em teores inferiores a 500 ppm. O substrato foi continuamente bombeado (bomba peristáltica SJ-1211-Hatto, ATTO, Japão) de um reservatório a 45 °C para o reator em fluxo descendente em diferentes vazões (Figura 3.3).

Figura 3.3 - Esquema experimental das reações em reator de leito fixo de um estágio operando em regime contínuo.

Fonte: Própria.

No sistema reacional óleo fúsel e ácido oleico a lipase de *R. oryzae* foi imobilizada apenas na resina Diaion HP-20 e os experimentos foram efetuados em reatores de leito fixo de único estágio e de dois estágios. No segundo caso, foi inserida entre os reatores uma

coluna empacotada com peneira molecular para remoção da água formada no primeiro estágio, favorecendo o incremento da concentração do éster oleato de isoamila no segundo estágio, conforme metodologia descrita por FREITAS et al., 2011. Cada coluna enzimática foi empacotada com 2,7 g de lipase de *R. oryzae* imobilizada em resina Diaion HP-20 e a coluna extratora continha 7,30 g de peneiras moleculares, correspondendo uma razão de massa lipase imobilizada/peneiras moleculares de 1:3 (Figura 3.4).

As esterificações em cada um dos arranjos foram avaliadas utilizando uma mistura de óleo fúsel e ácido oleico na proporção molar de 1:1,5 na presença de isooctano. O teor de água no substrato foi mantido a valores iniciais inferiores a 500 ppm aplicando técnicas de desidratação utilizando peneiras moleculares. O substrato foi continuamente bombeado (bomba peristáltica SJ-1211-Hatto, ATTO, Japão) de um reservatório a 45 °C para o biorreator em diferentes vazões.

Figura 3.4 – Esquema experimental da reação de esterificação em 2 colunas em série operando em regime contínuo, empregando coluna extratora de umidade.

Fonte: Própria.

Tabela 3.4 - Condições operacionais testadas em regime contínuo.

Reator	Sistema reacional	Biocatalisador	Tempo espacial (h)	Resultados
Único estágio	Óleo fúsel e ácido láurico na presença de solvente	<i>R.oryzae</i> imobilizada em SiO ₂ -HEC	3,24	Capítulo 5
Único estágio	Óleo fúsel e ácido láurico na presença de solvente	<i>R.oryzae</i> imobilizada em resina Diaion HP-20	3,12	Capítulo 5
Único estágio	Óleo fúsel e ácido oleico na presença de solvente	<i>R.oryzae</i> imobilizada em resina Diaion HP-20	5,10	Capítulo 6
Duplo estágio	Óleo fúsel e ácido oleico na presença de solvente	<i>R.oryzae</i> imobilizada em resina Diaion HP-20	10,2	Capítulo 6

Fonte: Própria.

3.3.8 Purificação dos ésteres de isoamila

Os ésteres formados nas reações de esterificação foram coletados e transferidos para um funil de decantação e neutralizado com uma solução de Na₂CO₃ a 5% m/v (relação de volume 1:1), seguido pela adição de NaCl para separar as fases orgânica e aquosa. A fase orgânica foi destilada para remover qualquer presença de óleo fúsel residual (LIMA et al., 2018) e o produto formado analisado de acordo com as propriedades de interesse.

3.4 Métodos de análise

3.4.1 Densidade das enzimas imobilizadas

A densidade do recheio da coluna foi determinada em um balão volumétrico aferido com água à temperatura ambiente. Colocou-se uma massa conhecida do sólido em balão de 50 mL e volume completado com água, o sistema foi submetido a vácuo para eliminar o ar contido nos espaços intra e interpartículas. Completou-se o volume do balão volumétrico com água, sendo o volume ocupado pelo sólido obtido por diferença após preencher o balão. A densidade foi calculada como a relação entre a massa e o volume ocupado pelo sólido segundo a Equação 3.1 (SIMÕES et al., 2015).

$$\rho_w = \frac{\text{massa de enzima imobilizada}}{\text{Volume do balão} - \text{Volume de água}} \quad (3.1)$$

3.4.2 Teor de umidade das enzimas imobilizadas

A determinação do teor de umidade das enzimas imobilizadas foi feita medindo-se a perda de massa do material após secagem de uma quantidade conhecida (0,1 g) em balança analítica acoplada com infravermelho durante 15 min a 100 °C.

3.4.3 Determinação da atividade hidrolítica das lipases

As atividades enzimáticas das lipases livres e imobilizadas foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia modificada por Soares et al. (1999). Os ácidos graxos liberados foram titulados com uma solução de KOH previamente padronizada (0,02 mol L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio. As atividades foram calculadas segundo a equação 3.2 e expressas em μmol g⁻¹ min⁻¹ (U g⁻¹).

$$\text{Atividade hidrolítica } (\mu \frac{\text{mol}}{\text{gmin}}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (3.2)$$

Em que: V_a= volume de KOH gasto na titulação da amostra, V_b= volume do KOH gasto na titulação do branco, M= molaridade da solução de KOH, t= tempo de reação em min, m= massa em gramas.

3.4.4 Determinação da atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi determinada pela formação do oleato de etila na reação de etanol com ácido oleico a 40 °C empregando 0,5 g de preparação de lipase. A reação foi iniciada pela adição da lipase ao meio reacional (12 mL) em frasco fechado de 50 mL sob agitação de 150 rpm. Alíquotas foram retiradas do meio reacional em intervalos pré-determinados para quantificação das substâncias presentes. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que conduz à formação de 1 μmol de oleato de etila por minuto nas condições do ensaio. O cálculo da atividade foi baseado no coeficiente angular da parte linear da curva de concentração de produto em função do tempo. Esta análise foi efetuada somente para a lipase G imobilizada em suporte híbrido SiO₂-βCD e SiO₂-HEC.

3.4.5 Determinação de ácidos carboxílicos

A determinação de ácidos carboxílicos foi determinada conforme a metodologia descrita por DE CASTRO et al., 1997. Em Erlenmeyers de 150 mL, foram adicionados 0,1 g da amostra e 10 mL de álcool etílico a 95%, neutralizado com solução 0,05 mol/L de KOH e fenolftaleína, como indicador. A quantificação de ácidos graxos livres foi calculada pela equação 3.3.

$$AGL\left(\frac{g}{L}\right) = \frac{V \cdot [KOH] \cdot MM}{m} \quad (3.3)$$

Em que: V = Volume gasto de KOH na titulação (mL); [KOH] = Concentração da solução de KOH; MM = Massa molar do ácido carboxílico titulado; m = Massa da amostra (g).

3.4.6 Caracterização dos ésteres por RMN 1H

As estruturas dos ésteres sintetizados por via química e enzimática foram confirmadas pela análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (1H RMN). Os espectros foram obtidos no aparelho Varian modelo Mercury 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo sinal do TMS (Tetra-metil-silano - $\delta = 0$) em solvente $CDCl_3$. Cada espectro foi analisado calculando-se a integração dos números relativos de hidrogênio presente na estrutura química do éster de ácido em 0,00-6,00 ppm.

3.4.7 Caracterização dos ésteres por FT-IR

As amostras de ésteres sintetizadas por via enzimática foram analisadas por espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier para caracterizar a composição do material. As análises foram conduzidas em espectrômetro de modelo Spectrum GX (Perkin Elmer) empregando o método de transmissão na faixa de número de onda de 400 a 4000 cm^{-1} usando cristais de KBr, sendo medidos os valores de absorbância. Foram feitas 32 varreduras com resolução de 4 cm^{-1} . As amostras foram preparadas na forma de pastilhas de KBr, utilizando-se cerca de 2 mg da amostra seca e 20 mg de KBr.

3.4.8 Propriedades dos ésteres purificados

Os valores da viscosidade absoluta dos produtos purificados foram medidos em viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra) empregando o cone CP 42. As medidas foram realizadas a 40 °C empregando 1,0 mL de

fluido. A densidade dos ésteres foi determinada em densímetro digital Modelo DMA 35N EX (Anton Paar). As medidas foram realizadas a 20 °C utilizando 2 mL de amostra.

3.4.9 Determinação dos produtos formados e álcool consumido

As concentrações dos ésteres (caprilato, laurato e oleato) formados e álcoois consumidos foram quantificadas em cromatógrafo a gás (Modelo Varian CG 3800, Inc. Corporate Headquarters, Palo Alto, CA, USA) equipado com detector de chama ionizante. A coluna empacotada (80/100 mesh, 6ft, 2,0 mm ID X 1/8 OD) foi utilizada para os sistemas reacionais óleo fúsel e ácidos caprílico e láurico, enquanto a coluna capilar (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme) para o sistema óleo fúsel e ácido oleico. Para a quantificação dos ésteres foram implementadas as metodologias descritas no Apêndice D e sumarizadas nos Quadros 3.1 e 3.2.

Quadro 3.1 - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação dos ésteres caprilato e laurato de isoamila.

Condição	Caprilato	Laurato
Coluna	empacotada (80/100 mesh, 6ft, 2,0 mm ID X 1/8 OD)	
Padrão interno	Hexanol (50 g L ⁻¹)	Octanol (50 g L ⁻¹)
Rampa de temperatura	50 °C (2 min), 70 °C (2 min), 120 °C (3 min) e 170 °C (7 min)	50 °C (2 min), 70 °C (2 min), 120 °C (3 min) e 170 °C (9 min)
Taxa de aquecimento	20 °C min ⁻¹	20 °C min ⁻¹
Gás de arraste	Nitrogênio (25 mL min ⁻¹)	Nitrogênio (25 mL min ⁻¹)
Diluição da amostra	1:3 (amostra - heptano)	1:3 (amostra - hexano)
Injeção da amostra diluída	1:1 (amostra – padrão interno)	1:1 (amostra – padrão interno)
Tempo total de análise	20 min	22 min
Tempos de retenção		
PI	6,22 min	9,8 min
Álcool isoamílico	3,84 min	4,3 min
Éster	11,36 min	15,7 min

Fonte: Própria.

Quadro 3.2 - Condições de operação do cromatógrafo e parâmetros dos métodos de quantificação do éster oleato de isoamila.

Condição	Oleato
Coluna	capilar (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme)
Padrão interno	Octanol (10 g L ⁻¹)
Rampa de temperatura	40 °C (1 min), 70 °C (3 min), 120 °C (3 min) e 250 °C (5min)
Taxa de aquecimento	25 °C min ⁻¹
Gás de arraste	Nitrogênio (1 mL min ⁻¹)
Diluição da amostra	1:20 (amostra - hexano)
Injeção da amostra diluída	1:1 (amostra - padrão interno)
Tempo total de análise	21,2 min
Tempos de retenção	
PI	7,74 min
Álcool isoamílico	3,10 min
Éster	15,25 min

Fonte: Própria.

3.4.10 Identificação de aromas por nariz eletrônico

Utilizando o equipamento modelo Cyranose 320TM, marca Smiths Detection, fabricado por CyranoSciences INC (EUA) (Figura 3.5). A coleta de dados feita pelo nariz eletrônico se baseia na sucção do headspace da amostra e gravação dos resultados produzidos pelos sensores. É necessária uma prospecção das melhores condições de análise para ajustar os parâmetros, tais como: velocidade de sucção de ar, tempo de sucção para a formação da linha de base e sucção do headspace para estabilização dos sensores. Às vezes, faz-se necessária, a eliminação seletiva de sensores que não atingem o estado estacionário, por não alcançar a estabilização da resistência, aumentando-a continuamente desta forma e ficando o seu valor máximo em função do tempo de exposição, o que leva a erros de interpretação. Na maioria dos casos isso ocorre devido à hipersensibilidade de alguns sensores a alguns dos componentes do substrato utilizado. Uma vez encontrados os parâmetros ideais, inicia-se a coleta de dados.

Para a caracterização das matérias-primas estudadas, utilizou-se a vazão de 180 cm³/min para a sucção de ar e de 50 cm³/min para o headspace, com tempos de 10 s e 60 s, respectivamente. Os sensores 5, 6, 23 e 31 foram desativados por não atingirem estado estacionário. Foram acondicionados 5 mL de amostra para cada componente (ácido

caprílico, óleo fúsel e ésteres formados nas sínteses) separadamente em recipientes com 10 repetições para a leitura do nariz. O programa utilizado para estabelecer as condições de análise foi o PCnose. O método estatístico adotado para análise dos resultados foi o PCA (Principal Components Analysis - em português - Análise dos Componentes Principais), um método que reduz a quantidade de variáveis sem perder suas características principais (ABDI; WILLIAMS, 2010).

Figura 3.5 – Nariz eletrônico (Modelo - Cyranose 320TM).

Fonte: Própria.

3.5 Cálculos

3.5.1 Tempo espacial (τ)

O tempo espacial foi calculado de acordo com Levenspiel (2000), conforme as Equações 3.4 a 3.6. O progresso da esterificação foi monitorado por amostras coletadas na saída do reator para determinar os níveis de ambos os materiais de partida consumidos e o produto formado.

$$\tau = \frac{V}{v_0} \quad (3.4)$$

$$V = V_{\text{reator}} - V_{\text{catalisador}} \quad (3.5)$$

$$V_{\text{catalisador}} = \frac{w}{\rho} \quad (3.6)$$

em que: τ = é o tempo espacial (min), V = volume útil do reator (mL), v_0 = vazão volumétrica sobre a seção da coluna (mL min⁻¹), V_{reator} = volume total do reator, $V_{\text{catalisador}}$ = volume ocupado pelo catalisador no interior do reator, w = massa seca do biocatalisador (g), ρ = densidade cristalina do biocatalisador (g mL⁻¹).

Os valores de densidade adotados para a lipase *R. oryzae* imobilizada em sílica híbrida hidroxietilcelulose (SiO₂-HEC) e resina Diaion HP-20 foram de 1,8037 g mL⁻¹ e 0,6935 g mL⁻¹.

3.5.2 Produtividade

As produtividades foram definidas e calculadas para as reações de esterificação em regime contínuo de acordo com a Equação 3.7.

$$P_c = \frac{C \cdot Q \cdot \rho}{M_{\text{cat}}} \quad (3.7)$$

Em que: P_c = produtividade processo contínuo (g éster. g catalisador⁻¹. h⁻¹); C = concentração de ésteres na saída do reator (g éster/g meio); Q = vazão de coleta de produto (mL h⁻¹); ρ = densidade do meio na saída do reator (g. meio. mL⁻¹); M_{cat} = massa do catalisador (g catalisador).

3.5.3 Tempo de meia-vida da enzima imobilizada

A constante de desativação do biocatalisador (k_d) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) foram calculados com as Equações 3.8 e 3.9, respectivamente.

$$\frac{A}{A_0} = e^{-k_d \cdot t} \quad (3.8)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (3.9)$$

Em que: A_0 e A são as atividades hidrolítica inicial e residual, respectivamente, da enzima imobilizada.

A construção de um gráfico de $\ln (A_0/A)$ versus tempo (linearização da Equação 3.8) permite calcular a constante de desativação (k_d), que corresponde ao coeficiente angular da reta de ajuste dos pontos obtidos. O tempo de meia-vida foi calculado pela Equação 3.9 após a obtenção do valor de k_d .

REFERÊNCIAS

- ABDI, H.; WILLIAMS, L. J. Principal component analysis. **Wiley interdisciplinary reviews: computational statistics**, v.2, n.4, p.433-459, 2010.
- CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77/79, p. 827-826, 1999.
- CASTRO, H. F.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Parâmetros reacionais para a síntese enzimática do butirato de butila em solventes orgânicos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 3, p. 237-241, 1997.
- Fabricante Product Diaion HP20. Mitsubishi Chemical Corporation. Disponível em: www.diaion.com/en. Acesso em: 30/07/2018.
- FREITAS, L.; SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research & Technology**, v. 233, p. 743-750, 2011.
- LEVENSPIEL, O. **Chemical reaction engineering**. 3rd. ed. New York: Wiley, 2000.
- LIMA, L. C. D.; PERES, D. G. C.; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde activated rice husk particles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 991-1002, 2018.
- MARTIN, L. S.; CERON, A.; OLIVEIRA, P. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 462 -470, 2018.
- SIMÕES, A. S.; RAMOS, L.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; ZANIN, G. M.; DE CASTRO, H. F. Performance of an enzymatic packed bed reactor running on babassu oil to yield fatty ethyl esters (FAEE) in a solvent-free system. **Biofuel Research Journal**, v. 6, p. 242-247, 2015.
- SOARES, C. M. F.; CASTRO, H. F.; MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77-9, p. 745-757, 1999.
- URIOSTE, D. **Produção de biodiesel por interesterificação enzimática do óleo de babaçu com álcoois de cadeia curta**. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, FAENQUIL, Lorena-SP, 121p, 2004.

CAPÍTULO 4

ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL COM ÁCIDO CAPRÍLICO

*Capítulo previamente publicado: VILAS BÔAS, R. N. et al. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fúsel como matéria-prima. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017 (Anexo I).

4 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL COM ÁCIDO CAPRÍLICO

4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são descritos os resultados obtidos referentes a síntese enzimática do éster aromático: caprilato de isoamila. Os experimentos foram efetuados de acordo com metodologia descrita no capítulo 3.

O estudo referente a esta etapa foi inicialmente direcionado ao teste de seleção de fontes comerciais de lipase com potencial para aplicação na reação de esterificação proposta. Quatro lipases microbianas (*Candida rugosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus oryzae*) com diferentes características bioquímicas foram imobilizadas em suporte híbrido sílica- β ciclodextrina (SiO_2 - β CD) e utilizadas como biocatalisadores para mediar a reação de esterificação do álcool isoamílico com ácido caprílico em meio isento de solvente, em condições fixas de razão equimolar dos materiais de partida a 45°C sob agitação magnética (150 rpm). Todas as lipases testadas apresentaram potencial para catalisar a reação de esterificação, apresentando conversões molares do álcool isoamílico superiores a 70% em 24 h de reação. O melhor desempenho foi alcançado pela lipase de *Rhizopus oryzae* que forneceu rendimentos superiores a 80% em 24 h de reação em função da elevada atividade catalítica (cerca de 3.714 U g⁻¹), sendo selecionada para testes subsequentes utilizando óleo fúsel como fonte do álcool isoamílico.

Um delineamento experimental foi efetuado e a análise dos resultados revelou que a formação dos ésteres caprilato de isoamila foi fortemente influenciada pela variável razão molar ao nível de 95% de confiança. O modelo matemático proposto permitiu prever as condições que favorecem o alcance de elevados rendimentos da esterificação, sendo a reação maximizada (82 % em 24h) para meios reacionais constituídos de óleo fúsel e ácido caprílico na razão molar de 1:1,5 e temperatura de incubação de 45 °C.

O perfil de avaliação sensorial dos aromas dos três componentes envolvidos na reação (ácido caprílico, óleo fúsel e ésteres formados) permitiu verificar que os ésteres formados apresentaram aromas distintos das matérias-primas, sugerindo que ocorreram mudanças nos aromas dos materiais de partida antes e após as reações de esterificação. Os resultados descritos, neste capítulo, integram o artigo publicado no periódico: Química Nova (v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017), cuja versão completa é apresentada no Anexo I.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.2.1 Seleção da lipase para síntese do caprilato de isoamila

A imobilização das quatro fontes de lipase *Candida rugosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus oryzae* no suporte híbrido SiO₂-βCD forneceu elevada eficiência (> 60%), demonstrando que o procedimento de imobilização foi efetuado com sucesso, resultando em derivados imobilizados com elevadas atividades hidrolíticas variando na faixa de 2020 U g⁻¹ e 3714 U g⁻¹ (Tabela 4.1). O teor de água dos derivados imobilizados foi inferior a 8% visando reduzir a influência da água no meio reacional.

Tabela 4.1 - Atividade enzimática (U g⁻¹) e teor de umidade das preparações de lipases imobilizadas em SiO₂-βCD.

Enzima	Atividade catalítica (U g ⁻¹)	Teor de água (%)
<i>Candida rugosa</i> ¹	2.802 ± 43	4,94
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	2.020 ± 69	7,29
<i>Burkholderia cepacia</i> ¹	2.090 ± 70	6,82
<i>Rhizopus oryzae</i> ¹	3.714 ± 35	7,68

¹Método de hidrólise do azeite de oliva (emulsão 50%; pH 7,0; temperatura 37 °C).

Fonte: Própria.

Para selecionar o derivado imobilizado mais adequado na formação de ésteres secundários foram mantidas fixas as condições reacionais, incluindo o carregamento catalítico (350 unidades de atividade por grama de meio reacional). Os valores de conversão em éster para diferentes tempos de incubação (12, 24 e 48h) dispostos na Figura 4.1 indicam que todas as lipases testadas apresentaram potencial para catalisar a reação de esterificação, alcançando conversões superiores a 70% em 24 h de reação.

As lipases de *Pseudomonas fluorescens* e de *Burkholderia cepacia* foram menos eficientes. Entretanto, ao usar a preparação de *P. fluorescens*, obteve-se conversão mais elevada alcançando valores médios de 83,78% ± 7,43 em 48 h. Verificou-se que a lipase de *B. cepacia*, nas condições testadas, apresentou tendência de hidrolisar o éster após 24 h de reação, sendo a conversão em éster reduzida de 77,47% ± 1,98 para 70,19% ± 7,76.

Conversões similares foram obtidas pelas lipases de *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae*, que forneceram valores de conversão superiores a 80% em 24 h de reação. O progresso da reação catalisada por *R. oryzae* confirmou a potencialidade desta lipase para

mediar reações em meio orgânico (esterificação e interesterificação), conforme anteriormente reportado (DE PAULA et al., 2010).

Figura 4.1 - Conversão molar do álcool isoamílico durante a síntese do caprilato de isoamila mediada por diferentes fontes de lipases imobilizadas em SiO₂-βCD nos tempos de reações 12, 24 e 48 h (condições: temperatura = 45 °C, razão equimolar álcool/ácido e meio isento de solvente).

Fonte: Própria.

Desta forma, selecionou-se esta preparação de lipase para testes subsequentes. Adicionalmente esta lipase na forma imobilizada apresentou elevado tempo de meia-vida quando utilizada em processos descontínuos (com reciclo do sistema imobilizado) (PAULA et al., 2015a) e contínuos (PAULA et al., 2015b). Propriedades adicionais da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-βCD revelaram os seguintes parâmetros na hidrólise do azeite de oliva: $K_m = 852 \text{ mmol L}^{-1}$, $V_{max} = 52961 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e estabilidade térmica a 50 °C = 8,0 h.

4.2 Otimização da síntese do caprilato de isoamila

Tendo selecionado a lipase *R. oryzae* como a fonte enzimática mais efetiva na síntese do caprilato de isoamila, testes subsequentes foram efetuados substituindo o álcool isoamílico de grau analítico por óleo fúsel. As condições testadas na síntese de ésteres a partir do álcool isoamílico presente no óleo fúsel com o ácido caprílico estão apresentadas na Tabela 4.2, juntamente com os resultados obtidos expressos em conversão em éster para diferentes tempos de incubação (24 e 48 h).

Verifica-se, na Tabela 4.2, que utilizando ácido caprílico como doador do grupo acila, o biocatalisador selecionado foi efetivo na formação de ésteres em meio isento de

solventes, alcançando elevadas conversões (> 50%) nas primeiras 24 h de reação (ensaios 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Entretanto, constatou-se que para substratos contendo excesso de álcool (razão molar álcool: ácido= 1:0,5) foram obtidas conversões inferiores a 20%, independente da temperatura de incubação (ensaios 1, 3 e 5). Em 48 h de reação, observa-se que apenas as reações conduzidas em substratos contendo excesso de ácido (razão molar álcool: ácido= 1:1,5) alcançaram conversões superiores a 85% (ensaios 2, 4 e 6), independente da temperatura de incubação. Os dados obtidos indicam, de maneira geral, que o excesso de ácido garante a formação do complexo enzima-grupo acila para posterior reação com o álcool, conduzindo assim à formação do éster, e reduzindo, desta forma, a competição entre os aceptores, parâmetro essencial para a cinética de uma reação de esterificação (CHOI; HAN; KIM, 2015; STERGIOU et al., 2013). Isto sugere que a síntese de caprilato de isoamila catalisada pela lipase *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-βCD pode ser limitada pela concentração de ácido caprílico, sugerindo a necessidade de se trabalhar com excesso deste reagente.

Tabela 4.2 - Matriz experimental e resultados obtidos no planejamento composto de face centrada 2² utilizado para determinar as condições otimizadas da reação de esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel catalisada pela lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em SiO₂-βCD.

Ensaio	Variável codificada		Variável real		Variável resposta (conversão molar do álcool isoamílico %)	
	X ₁	X ₂	Razão Molar (álcool:ácido)	Temperatura (°C)	24h*	48h
1	-1	-1	1:0,5	40	17,10	33,77
2	+1	-1	1:1,5	40	74,41	85,18
3	-1	+1	1:0,5	50	13,60	29,82
4	+1	+1	1:1,5	50	89,23	88,89
5	-1	0	1:0,5	45	17,10	33,77
6	+1	0	1:1,5	45	85,86	90,91
7	0	-1	1:1	40	58,36	62,78
8	0	+1	1:1	50	62,15	62,46
9	0	0	1:1	45	63,77	63,77
10	0	0	1:1	45	66,17	63,17
11	0	0	1:1	45	57,19	61,98

*Valores considerados para a análise estatística.

Fonte: Própria.

As baixas conversões obtidas nas reações contendo excesso de álcool podem ser também correlacionadas com a polaridade global do sistema reacional determinada pelo parâmetro log *P*, definido como o coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água para compostos orgânicos (LAANE et al., 1987). De acordo com a literatura, os valores tabulados de log *P* para o álcool isoamílico é da ordem de 1,28, enquanto o

ácido caprílico possui um valor = 3,05. Desta forma, nos sistemas reacionais contendo excesso de óleo fúsel, a polaridade mais elevada do substrato pode modificar a interação do álcool com a água essencial ao redor da enzima limitando a migração do ácido para a fase sólida da enzima, resultando na redução da atividade da enzima (SUN et al., 2013; STERGIOU et al., 2013).

Esses resultados estão de acordo com o descrito por Sun et al. (2013) referente aos efeitos adversos causados pela elevada polaridade do óleo fúsel quando adicionado em meios reacionais, notadamente para meios contendo óleo fúsel em excesso.

Considerando os valores obtidos ao final de 24 h de reação, o efeito individual dos fatores experimentais e de suas interações sobre a conversão em éster foi avaliada estatisticamente utilizando o programa Statistica versão 13 (Tabela 4.3).

Tabela 4.3 - Estimativa dos efeitos para a conversão molar do álcool isoamílico de acordo com o planejamento fatorial 2^2 com face centrada para um nível de confiança 95%.

Variável	Efeito	Erro Padrão	Valor t	p
Média	62,53	1,56	39,96	0,0000*
(X ₁) Razão Molar	67,23	2,49	26,99	0,0000*
(X ₁ ²) Razão Molar	-22,60	3,83	-5,89	0,0019*
(X ₂) Temperatura	5,03	2,49	2,02	0,0990
X ₂ ²) Temperatura	-5,05	3,83	-1,31	0,2442
X ₁ . X ₂	9,16	3,05	3,00	0,0299*

*p: efeitos significativos para valores de $p < 0,05$.

Fonte: Própria.

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, valor de p e valor de t para a resposta analisada mostraram que as variáveis linear (X₁) e quadrática (X₁²) (razão molar) foram estatisticamente significativas para um nível de confiança de 95%, indicando que excesso de ácido ocasiona maior consumo de álcool e consequentemente maior formação do éster. Verifica-se ainda que o efeito da variável temperatura (X₂) não foi estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, sugerindo que esta variável não exerce influência significativa na formação do éster. Entretanto, a interação X₁ e X₂ foram estatisticamente significativas para um nível de confiança de 95%, demonstrando que a temperatura quando combinada com a razão molar exerce influência significativa na conversão em éster (%).

Os efeitos principais para a conversão foi ajustado por análise de regressão múltipla para um modelo polinomial e a melhor função ajustada pode ser descrita pela Equação 4.1, em que: Y é a variável resposta (conversão em éster %) e X₁ e X₂ representam os valores codificados para razão molar e temperatura, respectivamente.

$$Y = 62,53 + 33,61X_1 - 11,30X_1^2 + 4,58X_1X_2 \quad (\text{Eq. 4.1})$$

A significância estatística dos efeitos principais e da interação dos fatores sobre a formação do caprilato de isoamila foi realizada por análise de variância, como mostrado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta conversão molar (%).

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,05
X ₁	6780,48	1	6780,48	728,71	0,0000*
X ₁ ²	323,69	1	323,69	34,78	0,0019*
X ₂	38,05	1	38,05	4,08	0,0990
X ₂ ²	16,19	1	16,19	1,74	0,2442
X ₁ X ₂	83,90	1	83,90	9,01	0,0299*
Erro puro	46,52	5			
R ²	0,9936				

F: teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo.

*Significativo ao nível de significância de 95% (p<0,05).

Fonte: Própria.

Por meio dos resultados obtidos (significância de 95% do modelo $p<0,05$), pode-se concluir que há relação entre as variáveis e que análise de variância proporcionou um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Verifica-se ainda pelo valor de R² de 0,9936 que a equação ajustada foi capaz de explicar 99,36% da variabilidade dos valores experimentais.

Desta forma, considera-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para descrição da conversão em caprilato de isoamila em função da razão molar ácido/álcool e da temperatura, obtendo-se a superfície de resposta apresentada na Figura 4.2.

A observação da Figura 4.2 indica que a conversão em éster (%) foi dependente da razão molar (álcool/ácido) e da interação temperatura com a razão molar. Portanto, com o aumento da razão molar (álcool/ácido), a conversão aumenta gradativamente. Verifica-se ainda que para se obter elevadas conversões (> 80%) em 24 h de reação, a razão molar entre álcool e ácido deve ser maior que 1:1,5 e a temperatura de incubação maior que 40 °C. O experimento conduzido nas condições previstas pelo modelo (razão molar entre álcool/ácido de 1:1,5 e temperatura de 45 °C) indicou rápido consumo dos reagentes, atingindo conversões superiores a 82% em 24 h de reação, confirmando dessa forma o modelo matemático obtido (Figura 4.3).

Figura 4.2 - Superfície de resposta de acordo com a equação predita para conversão molar do álcool isoamílico (%) em função da razão molar álcool/ácido e temperatura.

Fonte: Própria.

Os resultados obtidos quando comparado aos dados descritos na literatura indicam comportamentos diferenciados em função da diversidade das fontes de lipases, polaridade do grupo acila, razões molares e tempo de reação (Tabela 4.5). A esterificação de ácidos carboxílicos com alcoóis catalisada por lipase é uma estratégia comum para a acilação de alcoóis primários, enquanto ainda permanece uma tarefa complexa para alcoóis secundários. Neste caso específico, a seleção de um doador do grupo acila apropriado influencia a reatividade da enzima significativamente.

Nos trabalhos identificados na literatura são descritos a utilização do óleo fúsel proveniente da fermentação de milho (WELSH; WILLIAMS, 1989), e proveniente da fermentação do caldo de cana-de-açúcar (DE CASTRO; MORIYA; RIBEIRO, 2000; MACEDO; PASTORE, 1997; DE CASTRO et al., 1990). Apesar da diferença entre as unidades produtoras, bem como das concentrações dos alcoóis constituintes do óleo fúsel, álcool isoamílico, etanol e isobutanol sempre se apresentaram em maior proporção.

Figura 4.3 - Perfil de consumo do isobutanol (■) e álcool isoamílico (●) na formação dos ésteres caprilato de isobutila (□) e caprilato de isoamila (○) na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico nas condições estimadas pelo planejamento fatorial (razão molar (álcool/ácido) de 1:5 e temperatura de 45 °C).

Fonte: Própria.

Tabela 4.5 - Rendimento de éster relatado por vários autores e pelo presente trabalho, obtidos pela esterificação do álcool isoamílico proveniente do óleo fúsel com ácido carboxílico com diversas enzimas e sob diferentes tempos de reação.

Enzima	Solvente	Substrato	Conversão de éster (%)	Tempo de reação (h)	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido caprílico /álcool isoamílico	82	24	Este trabalho
Lipozyme TL IM	heptano	ácido láurico /álcool isoamílico	92	8	DE CASTRO et al. (1990)
<i>Candida cylindracea</i>	hexano	ácido butírico /álcool isoamílico	65,8	48	WELSH; WILLIAMS (1989)
		ácido acético /álcool isoamílico	46,4	48	
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido propílico /álcool isoamílico	72	24	MACEDO; PASTORE (1997)
Novozym 435	isento	ácido acético /álcool isoamílico	75	8	GUVENÇ et al. (2007)
Lipozyme TL IM	hexano	ácido butírico /álcool isoamílico	93	18	ANSCHAU et al. (2011)
Novozym 435	isento	ácido oleico /álcool isoamílico	99,8	6	DORMO et al. (2004)

Fonte: Própria.

MACEDO; PASTORE (1997) testaram cinco lipases microbianas de *Geotrichum* sp., *Alcaligenes* sp., *Aspergillus* sp. 1068, *Aspergillus* sp. 1099 e *Rhizopus* sp. quanto à

capacidade de catalisar a síntese de ésteres formadores de aroma por esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando óleo fúsel como precursor. A natureza da enzima, assim como o tamanho da cadeia dos ácidos afetaram as conversões obtidas. Os resultados mais elevados foram obtidos na síntese do laurato de isoamila (88%) e propionato de isoamila (72%) utilizando a lipase de *Rhizopus* sp. em 24 h de incubação, seguido de 82% de conversão na síntese de acetato de isopropila por *Alcaligenes* sp. em 24 h de incubação.

O desempenho superior reportado por De Castro et al. (1990) empregando um sistema reacional composto de ácido láurico e óleo fúsel (conversões de 92% em 8 h de reação) pode ser relacionado ao biocatalisador utilizado (Lipozyme) uma preparação de lipase de *Mucor miehi* imobilizada em resina de troca iônica disponível comercialmente (CASTRO; ANDERSON, 1995). Este biocatalisador é considerado um dos mais adequados para mediar reações de esterificação, devido ao levado poder do suporte em adsorver a água formada durante a reação de síntese. Desta forma, mantendo condição adequada de baixo teor de água no meio reacional, reduzindo a ocorrência da reação inversa de hidrólise (CASTRO; ANDERSON, 1995).

Resultados similares foram obtidos por ANSCHAU et al. (2011) utilizando também Lipozyme TL IM na síntese do butirato de isoamila a partir do óleo fúsel e ácido butírico em quantidades equimolares na presença de hexano a 30 °C. Nessas condições foram relatados 93% conversão e concentração do butirato de isoamila de 1,0 mol L⁻¹ em 18 horas de reação.

GUVENÇ et al. (2007) utilizando o sistema reacional ácido acético e álcool isoamílico reportaram resultados de conversão de 75% (3,40 mol L⁻¹) em 8 h na reação catalisada pela lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym® 435) em meio isento de solvente, e verificaram que variável mais significativa foi a razão molar ácido/álcool (0,2: 0,8). Ainda WELSH E WILLIAMS (1989), reportaram produção máxima de uma mistura de éster de ácido butírico (0,62 mol L⁻¹; conversão = 65,8%) e éster de ácido acético (0,052 mol L⁻¹; conversões = 46,4%) em 48 h de reação utilizando a lipase *Candida cylindracea*. Dormo et al. (2004) construíram um sistema com pervaporação para ser utilizado na remoção da água produzida na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase Novozym® 435. Nas condições otimizadas o sistema foi adequado para obter elevadas conversões (99,8%) em 6 h de reação.

Desta forma, verifica-se que os resultados descritos no presente trabalho se comparam favoravelmente com os descritos na literatura, em termos de conversão em éster

nas condições empregadas (ausência de solventes, utilização de suporte não comercial e ausência de estratégia para remoção da água formada como subproduto).

4.2.3 Avaliação sensorial dos ésteres formados durante as reações de esterificação

Além da pureza das amostras e teor do componente de interesse (éster), diversas características físico-químicas e sensoriais são fundamentais para a aceitação de um produto pelo consumidor. Estas características são comumente avaliadas por técnicas de análise sensorial. A avaliação sensorial é uma medida qualitativa baseada em informações recebidas pelos sentidos humanos (ROCK; BARSAN; WEIMAR, 2008). Esta medida é muitas vezes realizada em painéis de análise sensorial, nos quais pessoas são empregadas para avaliar as características do produto (TIGGEMANN et al., 2016; MEILGAARD; CARR; CIVILLE, 2006). Métodos sensoriais de medida, no entanto, apesar de serem muito importantes e largamente empregados, parecem perder a precisão desejável em pesquisa científica em função da variabilidade inerente à avaliação individual de cada pessoa envolvida. Assim, o emprego de equipamentos capazes de realizar medidas mais objetivas e que possam pelo menos complementar a análise tradicional na avaliação da qualidade de produtos alimentícios é desejável. Neste caso, o uso de sensor olfativo artificial mostra-se como uma técnica promissora, pois permite detectar os diferentes aromas presentes no produto final, bem como monitorar a uniformidade e consistência dos aromas formados durante o processo (TIGGEMANN et al., 2016). Desta forma, os aromas dos três componentes, ácido caprílico, óleo fúsel e ésteres formados pela esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel foram avaliados pelos sensores gerando o perfil mostrado na Figura 4.4.

Figura 4.4 - Perfil de aromas dos materiais de partida e produtos obtidos na esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel.

Fonte: Própria.

O perfil permite a comparação dos aromas entre os materiais de partida e os produtos formados nas sínteses de ésteres. Verifica-se que os ésteres formados apresentaram aromas diferentes dos materiais de partida. Os ésteres são representados na cor vermelha, na região central da figura, ao seu lado esquerdo tem-se o ácido caprílico representado na cor preta, e ao seu lado direito tem-se o óleo fúsel na cor verde. Desta forma, é possível afirmar que ocorreram mudanças nos aromas dos materiais de partida antes e após as reações de esterificação.

Verifica-se ainda que o perfil do aroma referente ao óleo fúsel apresentou grande espalhamento, o que pode estar associado à composição mista de alcoóis presentes nesta matéria-prima. O mesmo comportamento foi observado para os aromas dos ésteres formados, porém em menor grau. Por outro lado, este comportamento não foi observado no caso do ácido caprílico por se tratar de reagente puro. Os componentes (1, 2 e 3) explicam juntos 96,68% das variações ocorridas entre as amostras, demonstrando que os sensores discriminaram as amostras satisfatoriamente.

4.3 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como enfoque sintetizar ésteres a partir da matéria-prima residual óleo fúsel utilizando lipases como catalisadores e como doador do grupo acila o ácido caprílico. Mediante testes de seleção de fontes de lipases microbianas, foi selecionada a lipase *R. oryzae* com potencial para aplicação na síntese do caprilato de isoamila resultando em elevadas conversões em 24 h de reação. As condições reacionais da síntese de ésteres utilizando óleo fúsel foram estabelecidas por planejamento experimental, avaliando o efeito das variáveis: temperatura e razão molar ácido/ álcool. A análise dos resultados revelou que a formação do caprilato de isoamila foi influenciada somente pela variável razão molar ao nível de 95% de confiança. O modelo matemático proposto permitiu prever as condições que favorecem o alcance de elevados rendimentos de formação do éster, sendo a reação maximizada (82% em 24 h) para meios reacionais constituídos de óleo fúsel e ácido caprílico na razão molar de 1:1,5 e temperatura de 45 °C. O perfil sensorial efetuado pelo nariz eletrônico permitiu uma comparação dos aromas entre materiais de partida e os produtos formados, sendo constatado que os ésteres formados apresentaram aromas bem distintos dos materiais de partida, sugerindo que ocorreram mudanças nos aromas dos materiais de partida antes e após as reações de esterificação.

REFERÊNCIAS

- ANSCHAU, A.; ARAGÃO, V. C.; PORCIUNCULA, B. D.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A.; BURKERT, J. F. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 11, p. 2148-2156, 2011.
- CASTRO, H. F.; ANDERSON, W. A. Fine chemicals by biotransformation using lipases. **Química Nova**, v. 16, n. 6, p. 544-554, 1995.
- CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. F. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77/79, p. 817-826, 1990.
- CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; RIBEIRO, R. R. biotransformação de óleo fúsel em ésteres aromatizantes: influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo. In: SIMPÓSIO IBERO- AMERICANO DE CATÁLISE, 17, FEUP Edições: Porto, 2000, 1, 793.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- DE PAULA, A. V.; NUNES, G. F. M.; DE LOURDES SILVA, J.; DE CASTRO, H. F., DOS SANTOS, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 4, p. 1146-1156, 2010.
- DÖRMÖ, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 229-234, 2004.
- GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; KAPUCU, H.; AYDOĞAN, Ö.; MEHMETOĞLU, Ü. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: optimization by response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 4, p. 778-785, 2007.
- LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, n.1, p. 81-87, 1987.
- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção de ésteres formadores de aroma. **Food Science and Technology**, v. 17, p. 115-119, 1997.
- MEILGAARD, M. C.; CARR, B. T.; CIVILLE, G. V. **Sensory evaluation techniques**. CRC Press, 2006.
- PAULA, A. V.; NUNES, G. F.; CASTRO, H. F.; SANTOS, J. C. Synthesis of structured lipids by enzymatic interesterification of milkfat and soybean oil in a basket-type stirred tank reactor. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 6, p. 1731-1737, 2015a.

PAULA, A. V.; NUNES, G. F.; OSÓRIO, N. M.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F.; FERREIRA-DIAS, S. Continuous enzymatic interesterification of milkfat with soybean oil produces a highly spreadable product rich in polyunsaturated fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 5, p. 608-619, 2015b.

RÖCK, F.; BARSAN, N.; WEIMAR, U. Electronic nose: current status and future trends. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 705-725, 2008.

STERGIOU, P. Y.; FOUKIS, A.; FILIPPOU, M.; KOUKOURITAKI, M.; PARAPOULI, M.; THEODOROU, L. G.; PAPAMICHAEL, E. M. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1846-1859, 2013.

SUN, J.; YU, B.; CURRAN, P.; LIU, S. Q. Lipase-catalysed ester synthesis in solvent-free oil system: is it esterification or transesterification. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2828-2832, 2013.

TIGGEMANN, L.; BALLEEN, S.; BOCALON, C.; GRABOSKI, A. M.; MANZOLI, A.; DE PAULA, H. P. S.; STEFFENS, C. Low-cost gas sensors with polyaniline film for aroma detection. **Journal of Food Engineering**, v. 180, n. 16-21, 2016.

WELSH, F. W.; WILLIAMS, R. E. Lipase mediated production of flavor and fragrance esters from fusel oil. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 6, p. 1565-1568, 1989.

CAPÍTULO 5

ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL COM ÁCIDO LÁURICO

*Capítulo previamente submetido: VILAS BÔAS, R. N. et al. 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, MS JBB-D-18-00419 (Anexo II).

5 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL COM ÁCIDO LÁURICO

5.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são descritos os resultados obtidos referentes a síntese enzimática do éster com propriedades emulsificantes: laurato de isoamila. Os experimentos foram efetuados de acordo com metodologia descrita no capítulo 3.

A exemplo do sistema reacional anterior, inicialmente foram efetuados testes visando selecionar a lipase com maior potencial para aplicação na reação de esterificação proposta. Cinco lipases microbianas (*Candida rugosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae* e *Penicillium camembertii*) foram imobilizadas em suporte híbrido sílica-hidroxietilcelulose (SiO₂-HEC) e utilizadas como biocatalisadores para mediar a reação de esterificação do álcool isoamílico com ácido láurico na ausência de solventes (razão equimolar dos materiais de partida, 45 °C e agitação mecânica de 150 rpm, por um período máximo de 72h). O melhor desempenho foi alcançado pela lipase de *R. oryzae* que forneceu rendimentos superiores a 82% em 24 h de reação, sendo selecionada para catalisar as reações de esterificação do ácido láurico e óleo fúsel como fonte do álcool isoamílico em sistemas operando em regime descontínuo e contínuo.

Enquanto nas reações em regime descontínuo nenhum efeito adverso foi constatado pela substituição do álcool isoamílico de grau analítico por óleo fusel, no sistema operando em regime contínuo, o biocatalisador selecionado apresentou desempenho limitado. Esses resultados podem ser creditados a elevada afinidade da matriz híbrida pela água formada como um subproduto, modificando a interação do substrato com a água essencial ao redor a enzima, limitando a migração de substrato para a fase sólida e reduzindo assim a atividade enzimática. Substituindo o suporte híbrido para uma matriz de caráter mais hidrofóbico, tal como o suporte polimérico (Diaion HP-20) foi possível manter uma operação estável do reator, atingindo produtividade média de éster de $794,43 \pm 66,04 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Testes complementares foram realizados utilizando concentração mais elevada do substrato para melhor compreender o papel da água no leito catalítico, sendo verificado comportamento similar ao encontrado anteriormente atingindo produtividade de $1598,68 \pm 135,79 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ e tempo de meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2}$) em 248 h.

Os resultados descritos, neste capítulo, integram o artigo submetido para publicação no periódico: Biomass and Bioenergy (MS JBB-D-18-00419), cuja versão completa é apresentada no Anexo II.

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Seleção de lipases para a síntese de laurato de isoamila

As lipases microbianas (*Candida rugosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*) imobilizadas em suporte híbrido sílica-hidroxietilcelulose (SiO₂-HEC) forneceram derivados imobilizados com elevada atividade catalítica em meio aquoso na faixa de 2184 a 3862 U g⁻¹, como mostrado na Tabela 5.1. É importante mencionar que a atividade catalítica da lipase *Penicillium camembertii* foi determinada em meio não-aquoso na esterificação do etanol com ácido oleico (PINTO; FREIRE; PINTO, 2014).

Tabela 5.1 – Atividade enzimática (U g⁻¹) e umidade das lipases imobilizadas em SiO₂-HEC.

Fonte de lipase	Código	Atividade catalítica (U g ⁻¹)	Umidade (%)
<i>Candida rugosa</i> ¹	LCR	2941±40	2,48±0,54
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	LAK	2184 ±44	3,23±1,79
<i>Burkholderia cepacia</i> ¹	LBC	2344 ± 53	2,82±1,46
<i>Rhizopus oryzae</i> ¹	LRO	3862 ±61	5,73±0,52
<i>Penicillium camembertii</i> ²	LG	106 ± 15	5,81±0,70

¹ Hidrólise de óleo de oliva (emulsão 50%; pH 7.0; temperatura 37 °C).

² Atividade de esterificação (etanol e ácido oleico, temperatura 40 °C).

Fonte: Própria.

Para evitar a reversibilidade da reação, cuidados especiais foram tomados para obter preparações imobilizadas com baixo teor de água ($\leq 6\%$ m/m). Como os testes de seleção foram destinados para efetuar uma avaliação inicial da atividade de esterificação das lipases, as reações foram conduzidas adotando condições fixas que podem não representar as condições ideais para atuação de todas as lipases. Numa reação típica, adicionaram-se 350 unidades de atividade do derivado imobilizado à mistura de álcool isoamílico e ácido láurico na razão equimolar. Os resultados da seleção para as lipases testadas são apresentadas em relação ao consumo dos materiais de partida e à formação de éster em função do tempo (Figura 5.1).

A observação da Figura 5.1 indica que todas as lipases testadas foram capazes de formar laurato de isoamila. No entanto, a incorporação de ácido láurico foi dependente da fonte de lipase, que pode estar correlacionada com a especificidade de cada biocatalisador.

Figura 5.1 – Perfil do consumo do álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação do éster (○) durante o progresso da reação de esterificação do álcool isoamílico com ácido láurico catalisada por lipases imobilizadas em SiO₂-HEC: (a) *Candida rugosa*, (b) *Pseudomonas fluorescences*, (c) *Burkholderia cepacia*, (d) *Rhizopus oryzae*, (e) *Penicillium camemberti*.

Fonte: Própria.

Dependendo da fonte de lipase, a maior conversão ocorreu entre 24-72 h quando as menores concentrações de ácido foram determinadas (Figura 5.1). Entre todas as lipases imobilizadas em SiO₂-HEC, a lipase de *R. oryzae* proporcionou maior conversão molar do ácido láurico ($\approx 82\%$ em 24 h). Um desempenho ligeiramente inferior foi alcançado pelas lipases de *Candida rugosa* (LCR), *Pseudomonas fluorescens* (LAK) e *Burkholderia cepacia* (LBC), que atingiram conversão molar semelhante às 48 h. A lipase G proporcionou o menor desempenho, atingindo conversão máxima (82%) somente em 72

horas. Desta forma, esta preparação de lipase foi considerada ineficaz para a reação proposta.

De acordo com os resultados resumidos na Tabela 5.2, dentre todas as lipases testadas, a lipase *R. oryzae* apresentou a maior atividade para a formação do laurato de isoamila (96,67 mmol h⁻¹) e foi selecionada para realizar as reações de esterificação do ácido láurico e óleo fúsel. Além disso, esta lipase tem demonstrado consistente desempenho na formação de ésteres diversos devido à sua alta regiosseletividade na acilação de álcoois primários e secundários (VILAS BÔAS et al., 2017).

Tabela 5.2 - Esterificação do álcool isoamílico com ácido láurico catalisada por diferentes fontes de lipases.

Fonte de lipase	Conversão molar (%)		Tempo de reação (h)	Laurato de isoamila (mol L ⁻¹)	Produtividade (mmol h ⁻¹)
	Ácido láurico	Álcool isoamílico			
<i>C.rugosa</i>	82,37	61,29	48	2,24	46,67
<i>P.fluorescens</i>	88,00	69,85	48	2,42	50,42
<i>B.cepacia</i>	89,07	69,88	48	2,31	48,12
<i>R.oryzae</i>	81,86	63,80	24	2,32	96,67
<i>P.camerbertti</i>	82,39	64,85	72	2,13	29,58

Fonte: Própria.

5.2.2 Esterificação enzimática de laurato de isoamila utilizando óleo fúsel

Tendo selecionado a lipase de *Rhizopus oryzae* como a lipase mais efetiva na síntese de laurato de isoamila, os testes subsequentes foram realizados substituindo o álcool isoamílico de grau analítico pelo óleo fúsel levando em consideração as condições previamente estabelecidas para um modelo similar de estudo (VILAS BÔAS et al., 2017). As reações foram conduzidas em reatores fechados de 50 mL contendo 20 mL do substrato sem a adição de solventes na razão molar álcool/ ácido de 1:1,5 (levando em consideração o teor de álcool isoamílico presente no óleo fúsel). A mistura foi incubada com lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-HEC por um período máximo de 72 h a 45 °C e o progresso da reação é mostrado na Figura 5.2. Os perfis de curva indicaram um consumo rápido de ambos os reagentes após 24 h, obtendo-se conversão molar total do ácido em 48 horas de reação.

Os dados obtidos indicam, de maneira geral, que o excesso de ácido láurico garantiu a formação do complexo acila-enzima para posterior reação com o álcool, levando à formação do éster e reduzindo, dessa forma, a competição entre os aceptores, parâmetro essencial para a cinética das reações de esterificação (CHOI; HAN; KIM, 2015; FABER,

2011). Isto sugere que a síntese de laurato de isoamila catalisada por *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-HEC pode ser limitada pela concentração de ácido láurico, indicando a necessidade de se trabalhar com maior excesso deste reagente para compensar o desvio do ácido láurico para formar pequenos níveis dos outros ésteres, tais como lauratos de etila, isopropila e isobutila.

Figura 5.2 - Perfil do consumo de álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação de laurato de isoamila (○) na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido láurico em processo descontínuo (razão molar de álcool e ácido de 1:1.5 e temperatura de 45 °C).

Fonte: própria.

Como anteriormente mencionado, o óleo fúsel possui uma composição complexa em álcool como fonte de nucleofílicos que também consome o ácido láurico disponível no meio de reação. Tais resultados se comparam favoravelmente em relação aqueles descritos na literatura (CASTRO et al., 1999) que alcançaram 90% de rendimento após 24 h usando Lipozyme como catalisador a 60 °C em meio a solvente (heptano).

5.2.3 Síntese do laurato de isoamila em processo contínuo

Inicialmente, foi feita uma tentativa de operar o reator de leito fixo utilizando as condições previamente determinadas para o processo descontínuo, entretanto, a operação do reator, com alimentação de substrato isento de solvente foi limitada devido as propriedades físicas do ácido láurico (ponto de fusão ≈ 43 °C), o que tornou inviável a manutenção estável do sistema em função da baixa solubilidade do ácido láurico na temperatura do processo (45 °C). Como o aumento da temperatura prejudicaria a

estabilidade térmica da lipase, foi tomada a decisão de alimentar o reator com o substrato diluído utilizando iso-octano como solvente. Assim, o meio de alimentação foi preparado mantendo a mesma razão molar 1:1,5 (óleo fúsel:ácido láurico) e adicionando iso-octano suficiente para reduzir para cerca de $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ a concentração inicial do álcool isoamílico. Utilizando a lipase de *R. oryzae* imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-HEC}$ com uma atividade hidrolítica de $3500 \pm 120 \text{ U g}^{-1}$, o reator de leito fixo foi carregado numa proporção de 80% do leito catalítico. Os experimentos foram realizados a 45°C com fluxo de $1,8 \text{ mL h}^{-1}$ correspondendo a um tempo espacial de 3,24 h.

Os resultados apresentados na Figura 5.3 indicam que o estado estacionário foi atingido em 6 horas e esta condição foi mantida por pelo menos 36 horas (12 tempos espaciais). Durante este período, foi detectado consumo total do álcool isoamílico e 90% de ácido láurico, com consequente formação de $0,40 \text{ mol L}^{-1}$ de laurato de isoamila, correspondendo a uma produtividade volumétrica de $277,8 \pm 19,3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Figura 5.3 – Perfil de consumo de álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação de laurato de isoamila (○) na esterificação do óleo fúsel com ácido láurico usando lipase imobilizada em $\text{SiO}_2\text{-HEC}$ em fluxo contínuo.

Fonte: Própria.

Como esperado, esse desempenho foi maior do que o obtido no processo descontínuo. No entanto, após esse curto período tempo (48 h), observou-se redução gradual da formação do éster devido à água formada como subproduto, que provavelmente foi parcialmente adsorvida no suporte de imobilização. Este é um efeito bem conhecido nas reações de esterificação mediadas por lipases em que a quantidade de água afeta tanto a conversão dos reagentes como a distribuição do produto formado no meio reacional, ou

seja, à medida que a quantidade de água aumenta, conversões menores são detectadas (FORESTI; FERREIRA, 2007; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Esses resultados podem ser interpretados em função da elevada afinidade da matriz híbrida para a água formada como subproduto, modificando a interação do substrato com a água essencial ao redor da enzima limitando a migração do substrato para a fase sólida e, com isso, reduzindo a atividade da enzima. Isto foi confirmado, determinando o tempo de meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2}$) que revelou 173 h.

Na literatura, várias estratégias são descritas para remoção da água formada como subproduto, visando minimizar a reação reversa de hidrólise (TAMBORINI et al., 2017; FREITAS et al., 2011), entretanto, no presente estudo, foi tomada a decisão de substituir a matriz à base de sílica por uma matriz de caráter mais hidrofóbico (resina Diaion HP-20) para imobilizar a lipase de *R. oryzae*. Esta resina é manufaturada a partir de copolímero de poliestireno/divinilbenzeno e é considerada uma excelente matriz para imobilização de lipase por adsorção física (ALVES et al., 2017; PALANISAMY; KUPPAMUTHU; JEYASEELAN, 2015; PINTO; FREIRE; PINTO, 2014; HERNANDEZ; GARCIA-GALAN; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011). A adsorção de lipase neste tipo de suporte geralmente leva ao aumento da atividade catalítica. Isto é interpretado em analogia com a ativação interfacial causada pela fase hidrofóbica do substrato, ou seja, as interações hidrofóbicas entre o suporte e a abertura da tampa da lipase modificam a molécula de lipase para uma conformação mais ativa (ALVES et al., 2017; ADLERCREUTZ, 2013). Utilizando este suporte, foi possível obter um derivado imobilizado com elevada atividade hidrolítica $2504 \pm 36 \text{ U g}^{-1}$ e baixo teor de água (3%), o qual foi utilizado para operar o reator de leito fixo sob as mesmas condições anteriores (vazão = $1,8 \text{ mL L}^{-1}$ e tempo espacial = 3,12 h).

Os resultados exibidos na Figura 5.4 indicam que a lipase imobilizada em resina polimérica proporcionou melhor desempenho do sistema operacional do que a matriz híbrida, permitindo que o estado estacionário fosse alcançado em 9 horas (3 tempos espaciais) atingindo em média de $0,42 \text{ mol L}^{-1}$ de laurato de isoamila, refletindo no alto consumo de ácido láurico e álcool isoamílico. Observou-se também que não houve diferenças significativas na formação de laurato de isoamila durante todo o processo operando de forma contínua (144 h), revelando produtividade média de $794,43 \pm 66,04 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e elevado tempo de meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2} = 285 \text{ h}$).

Figura 5.4 – Perfil de consumação de álcool isoamílico (●) e ácido láurico (■) na formação de laurato de isoamila (○) usando lipase imobilizada em resina HP 20 Diaion.

Fonte: Própria.

A Tabela 5.3 compara o desempenho das reações de esterificação realizadas com a lipase imobilizada em cada suporte testado. Para ambos os experimentos, o estado estacionário foi obtido com menos de 3 tempos espaciais (9 h), e o melhor desempenho do reator foi constatado no sistema operando com a lipase imobilizada na resina Diaion HP-20.

Tabela 5.3 - Comparação do desempenho da lipase *R. oryzae* imobilizada em diferentes suportes na esterificação do óleo fúsel com ácido láurico conduzida em reator de leito fixo em fluxo contínuo, com razão molar de óleo fúsel e ácido (1:1,5) na presença de iso-octano em 45 °C.

Parâmetros	Lipase-SiO ₂ -HEC	Lipase-Diaion HP-20
Atividade biocatalítica (U g ⁻¹)	3862 ± 86	2846 ± 69
Taxa de fluxo (mL h ⁻¹)	1,8	1,8
Tempo espacial (h)	3,24	3,12
Concentração de isoamílico (mol L ⁻¹)	0,40	0,42
Ácido láurico (mol L ⁻¹)	0,56	0,61
Concentração de água % (inicial)	0,02	0,03
Concentração de água % (final)	0,04	0,18
Conversão molar (%)	100	100
Concentração do produto (mol L ⁻¹)	0,43 ± 0,03	0,40 ± 0,03
Produtividade (μmol g ⁻¹ min ⁻¹)	277,8 ± 19,3	794,43 ± 66,04
Biocatalisador tempo de meia vida (h)	173	285

Fonte: Própria.

Isso pode ser creditado à baixa afinidade do suporte pela água gerada como subproduto, sugerindo que essa imobilização reduziu o caráter hidrofílico do derivado imobilizado, de acordo com os grupos polares presentes na resina. Desta forma, tanto o

produto como a água gerada foram continuamente removidos do ambiente enzimático e, portanto, o estado estacionário dentro do reator foi controlado sem a necessidade de técnicas adicionais de remoção de água. Esse comportamento pode ser melhor visualizado na Figura 5.5, que mostra o perfil da concentração de água na saída do reator em ambos experimentos. Enquanto, a concentração de água no reator de leito empacotado com a lipase imobilizada em suporte híbrido diminuiu em função do tempo, confirmando que a água gerada como subproduto foi parcialmente adsorvida no suporte, o contrário foi observado no reator carregado com a lipase imobilizada em resina polimérica. Neste caso, a concentração da água na saída do reator foi gradualmente aumentada de 0,02 a 0,12%, sem diminuir a atividade do biocatalisador ou interferir na direção da reação (síntese).

Figura 5.5 – Monitoramento do teor de água (%) na fase líquida como função de tempo na performance da síntese de laurato de isoamila em reator de leito fixo carregado com *R. oryzae* imobilizada em diferentes suportes (∇) SiO_2 -HEC e ($\blacktriangle$) resina HP 20 Diaion.

Fonte: Própria.

Experimentos complementares foram conduzidos para melhor compreender o papel da água no leito catalítico, por meio da realização de reações de esterificação empregando concentrações mais elevadas dos materiais de partida ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$ de álcool isoamílico). Este é um ponto importante, uma vez que a concentração do substrato pode afetar a atividade da enzima e também a distribuição de água no meio. Apesar deste aumento, observou-se comportamento semelhante ao encontrado anteriormente e uma operação estável do reator foi mantida durante todo o ciclo contínuo, atingindo concentração média de $0,80 \pm 0,08 \text{ g L}^{-1}$, correspondendo a uma produtividade volumétrica de $1598,68 \pm 135,79 \mu\text{mol. g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e tempo de meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2}$) em cerca de 248 h (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Formação de laurato de isoamila em reator de leito fixo carregado com *R. oryzae* imobilizada em resina HP 20 Diaion alimentado com substrato em alta concentração ($0,8 \text{ mol L}^{-1}$) de álcool isoamílico.

Fonte: Própria.

O produto obtido foi purificado e as propriedades determinadas em relação à viscosidade cinemática a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($5,64 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), densidade ($807,6 \text{ kg m}^{-3}$) e teor de água (0,036%) foram semelhantes às encontradas em produtos comerciais recomendado para ingredientes utilizados em formulações cosméticas. Em particular, pode ser mencionado o ECOSILK, um produto comercializado pela Aromatic Ltd (Bélgica), um emoliente líquido incolor, comumente usado em cosméticos e produtos de cuidados da pele, como solvente, agente transportador, agente umectante de pigmentos ou fixador de fragrância. Contém 90% de laurato de isoamila e 10% de cocoato de isoamila com as seguintes propriedades: ácido (mgKOH g^{-1}): 1,0; Densidade a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (kg m^{-3}): 850 - 890 e viscosidade a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\text{mm}^2 \text{ s}^{-1}$): 3,9 (ECOSILK, 2018).

Esses resultados demonstram que o sistema proposto neste estudo foi altamente satisfatório e superior aos sistemas relatados na literatura (Tabela 5.4) e confirmam a importância de levar em conta um controle rígido de água em todo o processo, incluindo a polaridade do suporte utilizado como matriz para imobilização da lipase selecionada.

Tabela 5.4 – Produção de ésteres de laurato em processo contínuo usando diferentes álcoois em comparação com resultados obtidos no presente estudo.

Lipase	Materiais de partida	Solvente	Razão molar álcool: ácido	Fluxo (mL h ⁻¹)	Tempo espacial (h)	Conversão molar (%)	Concentração de produto (mol L ⁻¹)	Produtividade (μmol.min ⁻¹)	Referências
Novozym 435®	ácido láurico /butanol	hexano	0,2: 0,2	0,06	2	67	não relatado	não relatado	WOODCOCK et al. 2008
Lipozyme IM™	ácido láurico /isopentanol	hexano	1:2	270	0,43	97	não relatado	435,6 ± 0,9	CHANG et al. 2007
Lipozyme IM™	ácido láurico /hexanol	ausente	0,3	3,0	não relatado	60	não relatado	81,58 ± 1,76	JU et al. 2008
<i>R. oryzae</i> imobilizada em resina Diaion	ácido láurico/ óleo fúsel	iso-octano	0,80: 1,2	1,8	3,12	100	0,80 ± 0,07	4273 ± 373	Este trabalho

Fonte: Própria.

WOODCOCK et al. (2008) relataram que a reação de esterificação do álcool butílico com ácido láurico, utilizando Novozym 435 como catalisador, obteve um rendimento de 99% de laurato de butila em fluxo contínuo; entretanto também foi relatado uma redução significativa do rendimento para 67% após 2 h (isto é, uma redução de 23,1%). Por outro lado, CHANG et al. (2007) relataram que em condições otimizadas (sistema solvente n-hexano, temperatura de 45 °C, razão molar 1:2 substrato e 4,5 mL min⁻¹ de fluxo de reação; tempo espacial = 75 min), foi possível obter alta conversão molar 97% (435,6 μmol min⁻¹). Na síntese de laurato de hexila catalisada por Lipozyme IM como catalisador em um sistema livre de solvente em reator de leito fixo em processo contínuo, Ju et al. (2008) relataram que a produtividade em éster de 81,58 ± 1,76 μmol min⁻¹ pode ser alcançada a 55 °C, numa vazão de 0,5 mL min⁻¹ e concentração de ácido láurico de 0,3 mol L⁻¹. Nestas condições, a conversão máxima obtida foi de 60%.

5.3 CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou a potencialidade da aplicação do óleo fusel como fonte de baixo custo do álcool isoamílico na obtenção do éster laurato de isoamila com excelente capacidade de dispersão de pigmentos que pode ser utilizado na formulação de diversos cosméticos com rotulagem de produto natural. A seleção das condições operacionais, incluindo, fonte de lipase adequada e suporte altamente hidrofóbico contribuíram para o desenvolvimento de um sistema operacional estável que forneceu elevada produtividade volumétrica e elevado consumo de ácido láurico e álcool isoamílico. Estes resultados podem ser destacados em função dos benefícios do processo contínuo, no qual há possibilidade da preservação das características estruturais, morfológicas e catalíticas do biocatalisador ($t_{1/2} \approx 248$ h).

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- ALVES, M. D.; ARACRI, F. M.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1-12, 2017.
- CASTRO, H. F.; MORIYA, R. Y.; OLIVEIRA, P. C.; SOARES, C. M. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase: scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p. 817-826, 1999.
- CHANG, S. W.; SHAW, J. F.; YANG, C. K.; SHIEH, C. J. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1362-1366, 2007.
- CHOI, J. M.; HAN, S. S.; KIM, H. S. Industrial applications of enzyme biocatalysis: current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 7, p. 1443-1454, 2015.
- ECOSILK, Product Specification Isoamyl Laurate.
<<https://www.aromantic.co.uk/technical-documents/specifications/ecosilk-specification-sheet-aro.aspx>> Acesso em 15 Jul. 2018.
- FABER, K. **Biotransformations in organic chemistry**: a textbook, 6rd ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 2011. 436p.
- FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 7, p. 1408-1425, 2005.
- FREITAS, L.; SILVA, G. S.; SANTOS, J. C.; OLIVEIRA, P. C.; CASTRO, H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **European Food Research and Technology**, v. 233, n. 5, p. 743-750, 2011.
- HARI KRISHNA, S.; KARANTH, N. G. Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. **Catalysis Reviews**, v. 44, n. 4, p. 499-591, 2002.
- HERNANDEZ, K.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 49, n. 1, p. 72-78, 2011.
- JU, H. Y.; YANG, C. K.; YEN, Y. H.; SHIEH, C. J. Continuous lipase-catalyzed synthesis of hexyl laurate in a packed-bed reactor: optimization of the reaction conditions in a solvent-free system. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 29-33, 2009.

PALANISAMY, K.; KUPPAMUTHU, K.; JEYASEELAN, A. *Bacillus* sp. PS35 lipase-immobilization on styrene-divinyl benzene resin and application in fatty acid methyl ester synthesis. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 39, 2015.

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

TAMBORINI, L.; FERNANDES, P.; PARADISI, F.; MOLINARI, F. Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 1, 2017.

VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fusel oil as feedstock. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017.

WOODCOCK, L. L.; WILES, C.; GREENWAY, G. M.; WATTS, P.; WELLS, A.; EYLEY, S. Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using novozyme 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 26, n. 6, p. 466-472, 2008.

YAHYA, A. R.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

CAPÍTULO 6

ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL COM ÁCIDO OLEICO

*Capítulo previamente submetido: VILAS BÔAS, R. N. et al. Biolubricant synthesis by enzymatic esterification of fusel oil with oleic acid in a two-stage packed bed reactor incorporating a water extraction column. Industrial & Engineering Chemistry Research, MS ie-2018-03823e (Anexo III).

6 ESTERIFICAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL COM ÁCIDO OLEICO

6.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo são descritos os resultados obtidos referentes a síntese enzimática do éster lubrificante: oleato de isoamila. Os experimentos foram efetuados de acordo com metodologia descrita no capítulo 3.

Tomando por base os resultados favoráveis obtidos nos sistemas reacionais anteriormente descritos nos capítulos 4 e 5, os experimentos de síntese do oleato de isoamila foram efetuados com a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte polimérico STY-DVB. O enfoque do estudo foi direcionado para o desenvolvimento de um sistema reacional eficiente que permita a obtenção de elevadas produtividades volumétricas. Para tanto, optou-se por uma configuração de reator de leito fixo em dois estágios acoplado com uma coluna empacotada com peneira molecular para eliminação da água formada como subproduto, operando em fluxo contínuo.

O desempenho do sistema proposto foi confirmado quantitativamente para tempo-espacial de 10,2 h, resultando em produtividades médias de $292,20 \pm 18,46$ ($\mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$), com perdas mínimas dos materiais de partida e boa estabilidade do biocatalisador, revelando tempo de meia-vida médio de 179,6 h. O éster obtido foi purificado e a pureza confirmada por infravermelho (FTIR-ATR) e análises de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN C^{13}) e prótons (RMN H^1). Adicionalmente, as propriedades do oleato de isoamila foram adequadas para uso como biolubrificante, surfactante e/ou aditivo para combustível.

Os resultados descritos, neste capítulo, integram o artigo submetido para publicação no periódico: Industrial & Engineering Chemistry Research (MS ie-2018-03823), cuja versão completa é apresentada no Anexo III.

6.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.2.1 Síntese de biolubrificante em modo descontínuo

Neste estudo, a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em STY-DVB foi utilizada como biocatalisador heterogêneo na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido oleico na presença de iso-octano. As condições experimentais foram otimizadas em estudo anteriormente realizado referente a esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico catalisada pela lipase *R. oryzae* imobilizada via adsorção física em um suporte híbrido (SiO_2 - β -ciclodextrina) (VILAS BÔAS et al., 2017). Assim, a síntese de ésteres foi conduzida sob as mesmas condições experimentais: 350 U de atividade por grama de substrato, 45 °C, 150 rpm e razão molar de óleo fúsel/ácido de 1:1,5.

O comportamento da reação fornece uma visão do desempenho da lipase *R. oryzae* imobilizada no STY-DVB à medida que ocorre o progresso da reação. Esse perfil da reação auxilia determinar o tempo necessário para se obter o maior rendimento de éster e, assim, aumentar a relação custo-benefício do processo. O progresso da reação foi determinado pelo consumo de reagentes - ácido oleico e álcool isoamílico, presente na composição do óleo fúsel (cerca de 65%), e formação do produto, neste caso, oleato de isoamila.

Como mostrado na Figura 6.1, a formação de éster foi gradualmente aumentada com o progresso do tempo de reação até 24 h quando a reação atingiu o equilíbrio fornecendo conversão total do álcool isoamílico em oleato de isoamila ($0,74 \pm 0,07 \text{ mol L}^{-1}$), correspondendo a produtividade de $10,28 \mu\text{mol}_{\text{éster}} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Os dados obtidos indicam, em geral, que o excesso de ácido oleico assegurou a formação do complexo acil-enzima para posterior reação com o álcool, levando à formação de éster e, com isso, reduzindo a competição entre os aceptores do grupo acila, parâmetro essencial pela cinética das reações de esterificação (VILAS BÔAS et al., 2017; YAHYA; ANDERSON; SANTOS; DE CASTRO, 2006; MOO-YOUNG, 1998). Verificou-se também que não houve reversibilidade nas reações de esterificação.

Tais resultados estão de acordo com dados descritos na literatura, em particular com os resultados relatados por OLIVEIRA et al. (2000) referentes a esterificação enzimática de butanol com ácido butírico na presença de heptano utilizando lipase de *Candida rugosa* imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno (STY-DVB) como biocatalisador. Neste caso, a análise da polaridade dos reagentes determinada como

coeficiente de partição apresentou maior valor para o butanol do que para o ácido butírico, favorecendo a migração do butanol para a fase sólida (lipase imobilizada). Assim, deve haver mais álcool do que ácido no sítio ativo da lipase imobilizada, exigindo um excesso de ácido no meio reacional para fornecer quantidades equimolares de reagentes e rendimentos satisfatórios. Nenhuma inibição da atividade da enzima foi detectada quando o ácido butírico foi usado em excesso. O progresso da esterificação foi limitado pela disponibilidade de ácido butírico no reator, e a maior porcentagem foi obtida quando a relação molar ácido: álcool foi de 1,5 para 1.

Figura 6.1 – Perfil de consumo do álcool isoamílico (○) e ácido oleico (□) na formação do oleato de isoamila (●) na reação de esterificação enzimática do óleo fúsel com ácido oleico em processo descontínuo (razão molar de álcool e ácido de 1:1,5 e temperatura de 45 °C) na presença de solvente.

Fonte: Própria.

Resultados semelhantes são também relatados para outras lipases, por exemplo, Vilas Bôas et al. (2017) estudando a esterificação de óleo fúsel com ácido caprílico catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-β-ciclodextrina, verificaram que a razão molar entre o óleo fúsel e o ácido caprílico foi o fator crítico para obtenção de alto rendimento de caprilato de isoamila, requerendo uma quantidade de ácido caprílico da ordem de 1,5 vezes do óleo fúsel. Essa similaridade de resultados pode ser atribuída ao caráter hidrofóbico de ambos os suportes (STY-DVB e SiO₂-β-ciclodextrina) e aos valores do coeficiente de partição obtidos para estes biocatalisadores imobilizados.

6.2.2 Síntese de biolubrificante em modo contínuo

Para verificar o papel da água na síntese enzimática contínua do oleato de isoamila, inicialmente, o reator de leito fixo (PBR) foi utilizado sem adoção de qualquer estratégia

para remoção da água formada. Nos resultados mostrados na Figura 6.2 verifica-se que o estado estacionário foi alcançado em 12 h (menos que 2 tempos espaciais) e a formação do oleato de isoamila permaneceu estável em $0,75 \pm 0,08 \text{ mol L}^{-1}$ ($649,69 \pm 32,60 \mu\text{mol}_{\text{éster}} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) até as primeiras 24h de processo. Em seguida, verificou-se uma redução gradual na formação do oleato de isoamila, atingindo concentração menor que $0,34 \text{ mol L}^{-1}$ em 48 h. Após este ponto, houve rápido aumento das concentrações dos materiais de partida e acentuada redução da formação do éster (dados não mostrados).

Figura 6.2 – Perfil da formação do oleato de isoamila na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico por lipase imobilizada em STY-DVB em processo de fluxo contínuo (reação controle, tempo espacial= 7,4 h; carga de biocatalisador =2.6 g; razão molar de álcool e ácido de 1:1,5 e temperatura de 45 °C na presença de solvente).

Fonte: Própria.

Esse comportamento era esperado devido ao acúmulo de água no interior do PBR (aumento do teor de água de 0,05 a 0,29%) após 48 h de corrida, o que alterou a polaridade do meio e o equilíbrio químico no sentido da hidrólise do éster. Embora baixa estabilidade operacional tenha sido observada, a produtividade alcançada foi cerca de 65 vezes maior do que à obtida no processo descontínuo.

Nas reações de esterificação, a adsorção de moléculas de água geradas durante a reação é importante para manter a estrutura tridimensional da lipase ativa (LIMA; PERES; MENDES, 2018; LAGE et al., 2016). No entanto, a alta capacidade de retenção de água pode levar a um decréscimo da atividade catalítica devido ao possível aumento da partição de álcoois de cadeia curta para o microambiente do biocatalisador, reduzindo drasticamente a formação do complexo enzimático-acila. Como já mencionado, uma possível migração de moléculas de ácido oleico presentes no meio reacional para os sítios

ativos das moléculas da lipase *R. oryzae* imobilizada, pode ocorrer devido à criação de um microambiente mais hidrofílico (PÁEZ et al., 2003). Embora um suporte hidrofóbico (resina STY-DVB) tenha sido utilizado para a preparação do biocatalisador, o acúmulo de água deve-se a sua interação com moléculas de lipase de *R. oryzae* imobilizada nas superfícies externa e interna do suporte. Esse acúmulo também pode acelerar uma possível dessorção de moléculas da lipase *R. oryzae* da superfície de suporte, levando a uma diminuição da atividade catalítica.

Portanto, para evitar a reversibilidade da reação foi utilizada peneiras moleculares como agente desidratante. Nesta estratégia experimental, a reação de esterificação contínua foi realizada em reator de leito fixo de dois estágios acoplado a uma coluna de peneiras moleculares para extração de água (Figura 6.3).

Figure 6.3- Montagem experimental utilizada na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico em reatores de leito fixo dois estágios conectado com coluna extratora de água: 1 banho para controle de temperatura; 2 reservatório de alimentação; 3 bomba peristáltica; 4, 6 colunas empacotadas com lipase imobilizada; 5 coluna empacotada com peneiras moleculares; 7 reservatório do produto; 8 (linha pontilhada) água corrente; 9 (linha contínua), corrente de alimentação.

Fonte: Própria.

Utilizando esta montagem experimental, foi possível substituir as peneiras moleculares saturadas por uma regenerada a cada dois tempos espaciais, de modo que a segunda coluna foi alimentada com meio contendo muito menor teor de água. Isso permitiu manter condições favoráveis para sustentar a direção da reação à síntese de éster. Como pode ser verificado na Figura 6.4, o teor de água no reator da primeira coluna foi gradualmente aumentado durante o curso da reação, enquanto na segunda coluna o teor de

água permaneceu quase constante para níveis inferiores a 0,4%, o que favoreceu a formação do éster.

Figura 6.4 - Teor de água no reator de leito fixo de dois estágios antes (coluna branca) e depois (coluna cinzenta) do extrator de coluna de água.

Fonte: Própria.

Utilizando-se uma vazão de $1,6 \text{ mL h}^{-1}$ (tempo espacial = 10,2 h), o estado estacionário foi alcançado em 12h e a concentração do éster manteve-se em média $0,93 \pm 0,06 \text{ mol L}^{-1}$ até 72 h de operação, seguindo da redução gradual após este ponto (Figura 6.5). Este arranjo experimental mostrou-se mais estável, permitindo a operação do sistema sob condições estáticas por 3 dias ($292,20 \pm 18,46 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{éster}} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), em contraste com apenas 1 dia observado com o reator de uma única coluna (controle).

Vale a pena notar o fato de que esses testes foram realizados usando condições fixas e, portanto, esses resultados devem ser tomados como uma tendência indicativa. Devido ao mecanismo complexo de reações de esterificação do ácido carboxílico insaturado de cadeia longa, como o ácido oleico, com álcool secundário, como o álcool isoamílico, estudos adicionais devem ser realizados levando-se em consideração o modelo termodinâmico para se obter um sistema reacional mais estável.

Figure 6.5 - Perfil de formação do oleato de isoamila antes (●) e depois (○) do extrator da coluna de água na esterificação do óleo fúsel com ácido oleico em PBR de dois estágios (tempo espacial = 10,2 h; carga de biocatalisador = 5,2 g; razão molar de 1:1,5 e temperatura de 45 °C na presença de solvente).

Fonte: Própria.

6.2.3 Estabilidade operacional do biocatalisador

Elevada estabilidade operacional do biocatalisador é necessária para o uso industrial de reações catalisadas por lipase sob operação contínua. A estabilidade do biocatalisador em PBRs é dependente de muitos fatores, como dessorção da enzima do suporte, obstrução dos poros por subprodutos, perda de suporte por atrito e obstrução do leito empacotado provocando desvios de desempenho (TAMBORINI et al., 2017). Nas reações de esterificação, como já discutido, o teor de água na reação impõe um fator limitante adicional (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). A Tabela 6.1 resume o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) e as constantes de inativação (k_d) do biocatalisador imobilizado estimados para cada montagem experimental (reator de leito fixo de um estágio e duplo estágios).

Esses parâmetros foram determinados ajustando os dados experimentais da síntese contínua do éster a um modelo cinético de inativação de primeira ordem (RAMOS et al., 2016). Os valores de k_d foram determinados a partir da inclinação da atividade relativa e do tempo de reação (Figura 6.6). Altos coeficientes de correlação ($R_2 > 0,98$) foram obtidos para ambos os conjuntos experimentais (controle e PBR em série com extrator de coluna de água), mostrando assim que este modelo pode ser usado com sucesso para descrever a inativação da enzima.

Tabela 6.1 - Estabilidade operacional da lipase *R. oryzae* imobilizada em STY-DVB sob reações contínuas de esterificação realizadas em um PBR.

Configuração experimental	Tempo de meia-vida do biocatalisador (h)	Constante de inativação (h^{-1})
Reação controle	59,3	0,012
PBR em série com coluna extratora de água	179,6	$3,85 \times 10^{-3}$

Fonte: Própria.

Figura 6.6 - Modelo cinético de inativação adaptado aos pontos experimentais da atividade catalítica de reação de controle- PBR um estágio (■), PBR em série com extrator de coluna de água (□), durante a esterificação contínua a 45 °C.

Fonte: Própria.

Os resultados mostraram que peneiras moleculares desempenham um papel importante no progresso da reação, atuando como agente receptor da água formada como subproduto. Além disso, a polaridade do meio reacional é um fator importante para a partição da água entre as fases líquida e sólida, que pode ser afetada pela estabilidade do biocatalisador quando quantidades insuficientes de peneiras moleculares foram utilizadas. Fica claro, a partir dos resultados obtidos, que a coluna extratora de água é uma alternativa potencial para manter estável a operação do reator, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador em 179,6 horas, que é cerca de três vezes maior que o obtido no reator de leito único.

6.2.4 Propriedades do éster

A mistura do produto foi composta de ésteres derivados da fração de óleo fúsel, ácido oleico não reagido e fração de óleo fúsel. Para obter o produto éster puro, a mistura do produto foi tratada para remoção dos materiais de partida remanescentes. A análise por espectroscopia ATR-FTIR foi utilizada para identificar as funções orgânicas dos reagentes (óleo fúsel e ácido oleico) e o produto majoritário (oleato de isoamila) e seus espectros estão ilustrados na Figura 6.7 a-c.

Figure 6.7 - Espectros de FTIR de amostras de óleo fusel, ácido oleico e oleato de isoamila.

Fonte: Própria.

De acordo com o primeiro espectro, o óleo fúsel apresenta uma banda intensa a 3320 cm^{-1} , que é atribuída ao grupo OH, confirmando a presença de álcoois. As bandas entre 2955 e 2871 cm^{-1} correspondem à vibração do estiramento simétrico e assimétrico dos grupos metileno e metileno C-H e a banda a 1055 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento da ligação simples C-O de um álcool primário.

No segundo espectro (ácido oleico), a faixa intensa em torno de 2971 cm^{-1} é devido ao estiramento de C-H sobreposto à ligação O-H, enquanto o alongamento vibracional do grupo carbonila da porção carboxílica foi observado a 1707 cm^{-1} . O OH apresentado em álcool isoamílico não foi detectado no espectro ATR-FTIR do oleato de isoamila (terceiro espectro), o que confirma a elevada pureza do produto. Além disso, a faixa intensa em 1737 cm^{-1} corresponde ao grupo carbonila do éster formado após a reação de esterificação e as bandas em 1244 e 1167 cm^{-1} ao alongamento vibracional do grupo $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ (LAGE et al. , 2016), confirmando assim a síntese de oleato de isoamila.

A síntese do éster também foi confirmada por análises de RMN C^{13} e RMN H^1 como mostrado na Figura 6.8 (a-b). De acordo com o espectro de RMN C^{13} do éster oleato de isoamila (Figura 6.8a), o pico de 174.00 ppm corresponde ao grupo carbonila $[-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{OCH}_2-]$ da estrutura do éster.

Figure 6.8 – Espectros de RMN C^{13} e RMN H^1 em amostras purificadas de oleato de isoamila.

Fonte: Própria.

A presença do éster também foi confirmada por dois picos de hidrogênio específicos que compõem o tripleto na região entre $2,25$ a $2,30\text{ ppm}$ do grupo metileno ligado ao grupo carbonila ao éster radical $[-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{OCH}_2-]$, e dois hidrogênios que

compreendem o tripleto na região entre o grupo metileno de 4,06 a 4,11 ppm ligado ao átomo de oxigênio $[-CH_2(C=O)OCH_2-]$. O espectro também mostra outros picos na região para os ésteres formados pelos outros álcoois presentes no óleo fúsel. As análises espectroscópicas (ATR-FTIR e RMN) confirmaram a síntese bem sucedida do oleato de isoamila.

Além disso, as propriedades determinadas em relação à viscosidade cinemática a 40 °C ($6,95 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), densidade ($820,6 \text{ kg m}^{-3}$), índice de viscosidade (171) e teor de água (0,06%) foram semelhantes aos descrito na literatura para oleato de isoamila comercial e outros produtos, tais como o éster de ácido dicarboxílico tipo DB 32 (DORMO et al., 2004).

6.3 CONCLUSÃO

Este trabalho relatou uma avaliação prática para uma potencial produção de biolubrificante pela reação de esterificação em processo contínuo. Para controlar a água formada como subproduto foi utilizado um reator de leito fixo de dois estágios acoplado a uma coluna extratora de água. Nas condições estabelecidas, foi possível obter produtividade de $292,20 \pm 18,46 \text{ } \mu\text{mol oleato de isoamila g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e estabilidade operacional satisfatória do biocatalisador ($t_{1/2} = 179,6 \text{ h}$), demonstrando um bom desempenho e alto potencial da configuração experimental testada. As propriedades físico-químicas do éster purificado foram muito semelhantes aos produtos disponíveis comercialmente, sugerindo que ele pode ser usado como lubrificante. Além disso, os resultados deste estudo indicaram que o planejamento cuidadoso do processo, incluindo a seleção da configuração do reator, carregamento da enzima, fonte da lipase, tempo espacial e remoção do subproduto, pode afetar fortemente a eficiência de produção do oleato de isoamila.

REFERÊNCIAS

- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406-6436, 2013.
- DÖRMÖ, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 229-234, 2004.
- LAGE, F. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H.; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56-67, 2016.
- LIMA, L. C.; PERES, D. G.; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 991-1002, 2018.
- OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; CASTRO, H. F.; MEI, L. H. I. Synthesis of butyl butyrate by microbial lipase immobilized onto styrene-divinylbenzene copolymer. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 632-636, 2000.
- PÁEZ, B. C.; MEDINA, A. R.; RUBIO, F. C.; MORENO, P. G.; GRIMA, E. M. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 845-853, 2003.
- RAMOS, L.; MARTIN, L. S.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Combined use of a two-stage packed bed reactor with a glycerol extraction column for enzymatic biodiesel synthesis from macaw palm oil. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 56, n. 1, p. 1-7, 2016.
- SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, n. 10, p. 1007-1011, 2006.
- VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; GIORDANI, D. S.; CASTRO, H. F. Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fusel oil as feedstock. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017.
- TAMBORINI, L.; FERNANDES, P.; PARADISI, F.; MOLINARI, F. Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification. **Trends in Biotechnology**, v. 36, n. 1, 2017.
- YAHYA, A. R.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 7-8, p. 438-450, 1998.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

7 CONCLUSÕES

Esta pesquisa foi desenvolvida visando propor o aproveitamento da matéria-prima residual óleo fúsel na síntese de ésteres a partir de catálise enzimática com diferentes ácidos carboxílicos, obtendo produtos com diferentes propriedades. Para tanto, muitos procedimentos foram estabelecidos, abrangendo desde experimentos de triagem de lipases adequadas, seleção de matrizes de imobilização, estabelecimento das condições experimentais para cada modelo reacional investigado, técnicas de purificação dos produtos alvos, na tentativa de melhorar a eficiência do processo e qualificar a pureza dos produtos obtidos.

Em um primeiro momento, foi efetuado um estudo teórico das variáveis envolvidas no desenvolvimento de reações enzimáticas visando à síntese de ésteres, desde a escolha do suporte de imobilização, dos processos de imobilização das enzimas, da configuração correta do reator e do uso de diferentes ácidos carboxílicos. Como relatado na pesquisa, à análise dos parâmetros de reação é destinada a favorecer a escolha do processo mais adequado para um dado reator e assim contribuir para elevar ao máximo a produtividade do sistema. Por definição, processos conduzidos em fluxo contínuo favorecem a obtenção de produtividades mais elevadas, tendo em vista que as etapas de carregamento e descarga do reator são eliminadas. Neste sentido, foi dada prioridade ao estabelecimento das condições adequadas de operação de reatores de leito empacotado em função das vantagens oferecidas por este sistema operacional para reações mediadas por lipase.

A partir de ácidos carboxílicos de diferentes tamanhos de cadeia carbônica (C8:0, C12:0 e C18:1) e da matéria-prima residual óleo fúsel a formação de ésteres com propriedades aromatizantes, emulsificantes e biolubrificantes foi avaliada utilizando lipases como catalisadores. Os resultados obtidos foram apresentados na forma de artigos publicados e/ou submetidos, perfazendo um total de 3 artigos.

Desta forma, no presente capítulo serão destacadas as principais considerações referentes ao trabalho experimental efetuado para cada par de ácido carboxílico e óleo fúsel, dando ênfase as condições operacionais estabelecidas visando superar as limitações apresentadas nas reações de esterificação direta, principalmente com relação à influência crítica da água gerada como subproduto, que pode afetar diretamente a velocidade de reação, extensão de reações paralelas de hidrólise, rendimentos do produto, atividade da enzima e seletividade da reação.

O primeiro artigo (publicado no periódico Química Nova, v.40. p. 541-547, 2017) foi dedicado para obtenção do éster aromático, caprilato de isoamila, em sistema isento de solvente. Inicialmente, foi avaliada a capacidade de síntese enzimática de lipases de diferentes fontes microbianas: *Rhizopus oryzae* (L036P), *Candida rugosa* (Tipo VII), *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* e *Penicillium camembertii*, todas imobilizadas em sílica- β -ciclodextrina (SiO_2 - β CD) e testadas individualmente como forma de maximizar o rendimento da reação. Entre as fontes testadas, a lipase de *Rhizopus oryzae* foi o biocatalisador mais ativo, tendo alcançado conversão em ésteres superior a 80% em 24 h, sendo selecionada para testes posteriores utilizando óleo fúsel como fonte de álcool isoamílico. Um delineamento experimental foi realizado e análise dos resultados revelou que a formação do caprilato de isoamila foi fortemente influenciada pela variável razão molar a 95% do nível de confiança. O modelo matemático proposto permitiu prever que o excesso de ácido caprílico (razão molar do óleo fúsel para ácido de 1: 1,5) e a temperatura de reação de 45 °C favorecem a reação para obter elevada conversão em éster. O perfil sensorial efetuado pelo nariz eletrônico permitiu uma comparação dos aromas entre materiais de partida e os produtos formados, sendo constatado que os ésteres formados apresentaram aromas bem distintos dos materiais de partida, sugerindo que ocorreram mudanças nos aromas dos materiais de partida antes e após as reações de esterificação.

Na sequência, o segundo artigo (em fase de avaliação no periódico Biomass and Bioenergy, MS N. JBB-D-18-00419) abordou as reações de esterificação do óleo fúsel com o ácido láurico em fluxo contínuo. A exemplo do sistema reacional caprilato de isoamila, inicialmente as lipases de *Rhizopus oryzae* (L036P), *Candida rugosa* (Tipo VII), *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* e *Penicillium camembertii* imobilizadas em sílica-hidroxietilcelulose (SiO_2 -HEC) foram testadas na esterificação do álcool isoamílico sintético com o ácido láurico em meio isento de solvente. O teste de triagem indicou que a lipase de *Rhizopus oryzae* foi também o biocatalisador mais ativo, alcançando elevada conversão (81,26%) em 24 h, sendo selecionada para testes posteriores utilizando óleo fúsel como fonte de álcool isoamílico em processos conduzidos em regime descontínuo e contínuo. A substituição do álcool isoamílico puro por óleo fúsel, não afetou o desempenho da lipase imobilizada em SiO_2 -HEC em regime descontínuo. Entretanto, em fluxo contínuo, constatou-se que o biocatalisador selecionado apresentou desempenho limitado (tempo de meia-vida = 173 h), fornecendo uma produtividade em éster da ordem de $277,8 \pm 19,3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. Estes resultados foram creditados à elevada afinidade da

matriz híbrida pela água formada como subproduto, acarretando modificação da interação do substrato com a enzima e limitando a migração do substrato para a fase sólida, reduzindo a atividade da enzima. Para superar tais limitações, foi adotada como estratégia a substituição do suporte de imobilização à base de sílica por uma matriz hidrofóbica (resina Diaion HP-20) para imobilizar a lipase de *Rhizopus oryzae*, reduzindo desta forma a adsorção da água formada como subproduto pelo biocatalisador. A utilização deste suporte forneceu derivados imobilizados com elevada atividade $2504 \pm 36 \text{ U g}^{-1}$ e baixo nível de água (3%) e permitiu manter estável a operação do reator sob as mesmas condições anteriormente testadas (vazão = $1,8 \text{ mL L}^{-1}$ e tempo espacial = 3,12 h), promovendo aumentos na produtividade média de éster ($794,43 \pm 66,04 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) e tempo de meia-vida do biocatalisador (285 h). Comportamento similar ao obtido anteriormente foi verificado para concentrações mais elevadas de substrato, sendo também possível manter estável a operação do reator ao longo do processo fornecendo concentrações de ésteres da ordem de $0,81 \pm 0,08 \text{ mol L}^{-1}$, correspondendo a produtividade de $1598,68 \pm 135,79 \text{ } \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. O tempo de meia-vida do biocatalisador ($t_{1/2}$) foi estimado em 248 h. Esses resultados demonstram que o sistema proposto foi altamente satisfatório e superior aos sistemas relatados na literatura e confirmam a importância de levar em conta um controle rígido de água em todo o processo, incluindo a polaridade do suporte utilizado como matriz para imobilização da lipase selecionada. O produto obtido foi purificado e as propriedades determinadas com relação à viscosidade cinemática a 40°C ($5.64 \text{ mm}^2 \text{ s}^{-1}$), densidade (807.6 kg m^{-3}) e teor de água (0.036%) foram similares aos produtos normalmente encontrados no comércio recomendados para elaboração de formulações de cremes e loções cosméticas. Desta forma, foi demonstrada a potencialidade da aplicação do óleo fúsel como fonte de baixo custo do álcool isoamílico na obtenção do éster laurato de isoamila com excelente capacidade de dispersão de pigmentos que pode ser utilizado na formulação de diversos cosméticos com rotulagem de produto natural. A seleção das condições operacionais, incluindo, fonte de lipase adequada e suporte altamente hidrofóbico contribuíram para o desenvolvimento de um sistema operacional estável que forneceu elevada produtividade volumétrica e elevado consumo de ácido láurico e álcool isoamílico. Estes resultados podem ser destacados em função dos benefícios do processo contínuo, no qual houve possibilidade da preservação das características estruturais, morfológicas e catalíticas do biocatalisador.

O terceiro artigo (em fase de avaliação no periódico Industrial & Engineering Chemistry Research, MS ie-2018-03823e) teve como enfoque a síntese do éster com propriedades lubrificantes, a partir da esterificação do ácido oleico e óleo fúsel. Diante do potencial de aplicação da lipase de *Rhizopus oryzae* verificada anteriormente nas sínteses do caprilato de isoamila e laurato de isoamila, esta fonte de lipase foi também selecionada para catalisar a síntese do oleato de isoamila. Os experimentos de esterificação de óleo fúsel com ácido oleico mediada pela *R. oryzae* imobilizada em copolímero de poliestireno/divinilbenzeno foram efetuados em reator de leito empacotado de dois estágios acoplado com uma coluna extratora de água operando em fluxo contínuo. A coluna extratora de água era recheada com peneira molecular e permitia sua substituição pelo menos a cada 2 tempos espaciais. Corridas contínuas sem aplicar técnicas de desidratação para a remoção de água formada foi usada como controle. O desempenho do sistema proposto foi quantitativamente confirmado para tempos espaciais de 10,2 h, resultando em produtividade de $292,20 \pm 18,5 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$, com perdas mínimas de matéria-prima. As características morfológicas e catalíticas da lipase imobilizada mostraram-se estáveis, revelando um tempo de meia-vida médio de 179,6 h. As propriedades do produto formado atenderam as especificações recomendadas para uso como biolubrificante. Entretanto, foi constatado limitação da especificidade da lipase de *R. oryzae* para ácido carboxílico insaturado, interferindo negativamente o desempenho do sistema (Apêndice E).

Dentro dos objetivos gerais propostos neste trabalho, foi possível produzir ésteres com diferentes propriedades a partir da matéria-prima residual óleo fúsel aplicando conceitos de biocatálise em meio não aquoso. A partir do exposto, verifica-se a potencialidade do óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres aromáticos, emulsificantes e lubrificantes fornecendo resultados equivalentes aos obtidos com o álcool isoamílico sintético. Torna-se evidente as vantagens que se obtêm com essa produção, uma vez que o aproveitamento desta matéria-prima residual não somente retira um composto indesejado do meio ambiente, mas também permite a geração de diferentes produtos de interesse industrial, constituindo-se, assim, em um forte apelo ambiental.

RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Em função do desempenho insatisfatório da lipase de *Rhizopus oryzae* verificado na catálise de ésteres a partir de ácido carboxílico insaturado, as seguintes etapas para desenvolvimento futuro são sugeridas:

- ✓ Substituir o ácido oleico por ácido esteárico e testar a configuração de reator anteriormente utilizada na síntese do oleato de isoamila;
- ✓ Testar outras fontes de lipase microbiana que não apresentam atividade limitada para ácidos carboxílicos insaturados;
- ✓ Investigar a potencialidade de se obter o éster oleato de isoamila a partir de rotas enzimáticas que não envolvem a formação de água, tais como reações de alcoolise ou transesterificação.

APÊNDICES

APÊNCIDE A – Características e atividade hidrolítica das enzimas livres

No desenvolvimento do presente trabalho, foram utilizadas cinco preparações de lipase *Candida rugosa* (LCR), *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* (AK), *Penicillium camembertii* (Lipase G) e *Rhizopus oryzae* (L036P) na forma livre as quais foram posteriormente imobilizadas em diferentes suportes.

Amostra comercial de lipase de *Candida rugosa* (LCR) é classificada como regioinespecífica e tem habilidade de liberar todos os tipos de ácidos graxos (tanto de cadeias médias e longas) independente da sua posição no triglicerídeo (FABER, 2011).

A *Burkholderia cepacia* é uma preparação enzimática desenvolvida pela Amano Enzyme Inc. Ela é muito utilizada para a separação de compostos ópticos ativos em síntese química. A enzima possui massa molar de 45 kDa, elevada atividade lipolítica e é uma lipase não específica (AMANO ENZYME, 2006). A lipase de *Burkholderia cepacia* possui elevada atividade em uma ampla faixa de pH (3,5-11), sendo que o seu valor ótimo varia de 7 a 8. Sua temperatura ótima é de 50 °C.

Lipase AK é uma preparação enzimática produzida por um único processo de fermentação de uma linhagem selecionada de *Pseudomonas fluorescens*. Como a maioria das lipases microbianas, as preparações comerciais disponíveis desta lipase possuem preferência estereoquímica para hidrólise de ésteres de álcoois secundários (FABER, 2011).

Lipase G é uma preparação enzimática lipolítica desenvolvida pela Amano Enzyme Inc e manufaturada por cultivo submerso de uma linhagem selecionada proveniente de *Penicillium camembertii*. É específica para mono e diglicerídeos, mas não para triglicerídeos. Esta lipase possui massa molar de 37 kDa e alta atividade de esterificação. A lipase G atua numa faixa de pH que varia de 4 a 7, sendo o seu valor ótimo igual a 5, e temperatura ótima de 45 °C (AMANO ENZYME, 2006).

Lipases de *Rhizopus oryzae*, microrganismo também denominado *R. arrhizus*, *R. javanicus*, *R. niveus*, *R. delemar* e *R. rhizopodiformis*, possuem massa molar de 28-67 kDa e são compostas por diferentes isoformas com pontos isoelétricos distintos (SAXENA et al., 2003). Tipicamente usada como suplemento alimentar, as lipases de *Rhizopus oryzae* apresentam boa estabilidade entre valores de pH de 3 a 8. As lipases da espécie *Rhizopus* possuem aplicações biotecnológicas em setores industriais, tais como: produção de surfactantes e produção de fármacos enantomericamente puros (ODA et al., 2003). As atividades das lipases livres estão apresentadas na Tabela D.1.

Tabela A.1 - Atividade enzimática (Ug-1) das lipases livres.

Enzima	Atividade catalítica U/g
<i>Candida rugosa</i> ¹	20.077,24 ± 190,73
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	15.383,67 ± 104,50
<i>Burkholderia cepacia</i> ¹	17.556,00 ± 250,78
<i>Rhizopus oryzae</i> ¹	23.813,64 ± 242,91

¹Método de hidrólise do azeite de oliva (emulsão 50%; pH 7,0; temperatura 37 °C).
Fonte: Própria.

REFERÊNCIAS

AMANO ENZYME Inc. Disponível em: <<http://www.amano-enzyme.co.jp>>. Acesso em: 06 de abril de 2018.

FABER, K. In: **Biotransformations in organic chemistry: a Textbook**, 6rd ed. Berlin: Springer Produktions-Gesellschaft, 2011. 436p.

ODA, Y.; YAJIMA, Y.; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M. Differences of *Rhizopus oryzae* strains in organic acid synthesis and fatty acid composition. **Food Microbiology**, v. 20, p. 371-375, 2003.

SAXENA, R. K.; SHEORAN, A.; GIRI, B.; DAVIDSON, W. S. Purification strategies for microbial lipases. **Journal of Microbiological Methods**, v. 52, p. 1-18, 2003.

APÊNDICE B – Certificado de análise do óleo fúsel**LABORATÓRIO DE ANÁLISES****Solicitante:** SÃO MARTINHO S/A - UNIDADE IRACEMA**Endereço:** USINA IRACEMA - ZONA RURAL - CAIXA POSTAL 31 - Iracemápolis - SP.**Data de Recebimento:** 24/10/2014**Data de Emissão:** 27/10/2014**Safra:** 14/15**CERTIFICADO DE ANÁLISE Nº 4813/2014.0****MATERIAL:** Óleo fúsel**IDENTIFICAÇÃO DA AMOSTRA:** ÓLEO FÚSEL**DATA DA COLETA:** 21/10/2014

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	VALOR
Água	% m/m	14,76
Álcool butílico + amílico	% m/m	73,22
Álcool Isoamílico	% m/m	64,98
Álcool Isobutílico	% m/m	7,86
Álcool N-Butílico	% m/m	0,38
Álcool N-Propílico	% m/m	1,27
Etanol	% m/m	9,22

OBSERVAÇÕES**COMPLEMENTARES**

Período de Execução das Análises: 27/10/2014 à 27/10/2014

OBS.: Resultado(s) representativo(s) da(s) amostra(s) recebida(s). Este Certificado não poderá ser reproduzido exceto na sua totalidade.

O valor indicado com o sinal “menor que” (<) significa abaixo do limite de detecção do respectivo método.

Nanci Aparecida Pinto Tahiguti
CRQ nº 04223192 - 4ª Região

Certificado eletrônico com garantia de autenticidade.

Fazenda Santo Antônio, s/n. Bairro Santo Antônio -Piracicaba, SP. CEP: 13400-970 - CP. 162.
Fone: 19 3429-8199 | Fax: 19 3429-8106 | www.ctc.com.br

APÊNDICE C - Caracterização dos padrões cromatográficos (caprilato de butila, caprilato de isoamila, laurato de isoamila e oleato de isoamila) por RMN¹H

Figura C.1 - Espectros de RMN H¹ (CDCl₃, δ, ppm, 300Hz) do padrão caprilato de butila.

Fonte: Própria.

Figura C.2 - Espectros de RMN H¹ (CDCl₃, δ, ppm, 300Hz) do padrão caprilato de isoamila.

Fonte: Própria.

Figura C.3 - Espectros de RMN H^1 ($CDCl_3$, δ , ppm, 300Hz) do padrão laurato de isoamila.

Fonte: Própria.

Figura C.4 - Espectros de RMN H^1 ($CDCl_3$, δ , ppm, 300Hz) do padrão oleato de isoamila.

Fonte: Própria.

APÊNDICE D - Estabelecimento do método cromatográfico para dosagem do consumo de álcool e formação de ésteres

As estruturas químicas dos ésteres sintetizados (caprilato de butila, caprilato de isoamila, laurato de isoamila e oleato de isoamila) foram confirmadas por RMN.

Para determinar os tempos de retenção de cada componente (álcool e ésteres) e rampas de temperaturas, as amostras foram diluídas em solvente e em seguida, 1 uL de cada amostra foi injetada no cromatógrafo. Os métodos foram estabelecidos e ativados segundo procedimento descrito por Urioste et al. (2008). Em seguida, os métodos foram calibrados com uma injeção de 1 uL da mistura dos ésteres e álcoois diluídos em solvente contendo o padrão interno previamente estabelecido.

As condições estabelecidas para o método de análise estão resumidas nas Tabelas D.1, D.2 e D.3 em termos de regulação do aparelho quanto às temperaturas (coluna, ionizador de chama, vaporizador), vazões (gás de chama e gás de arraste), atenuação e zeragem da linha de base no integrador. Exemplos de cromatogramas são ilustrados nas Figuras D.1, D.2 e D.3.

Tabela D. 1 - Condições de operação do cromatógrafo para o método de dosagem de consumo de álcoois e formação de caprilato de butila e caprilato de isoamila.

Coluna empacotada de aço inoxidável (80/100 mesh, 6FT, 2,0 mm ID X 1/8 OD, Marca Restek P/N PC13512)				
Padrão Interno (PI): Hexanol				
Temperaturas	Rampa de aquecimento: 50 °C por 2 min 70 °C por 2 min em 20 °C/min 120 °C por 3 min 170 °C por 7 min em 25 °C/min duração: 20 min	Ionizador 190 °C	Vaporizador 190 °C	Detector 230 °C
Vazão dos gases: Nitrogênio (25-30 mL/min); Hidrogênio (27 mL/min); Ar sintético (300 mL/min)				
Outras condições: amostra + padrão interno (1:1) e injetar 1 µL				
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)	
1	Heptano	1,22	-	
2	Butanol	3,57	59,50	
3	Álcool isoamílico	4,24	77,40	
4	Hexanol	6,11	51,30	
5	Caprilato de butila	11,24	37,00	
6	Caprilato de isoamila	12,11	45,40	

Fonte: Própria.

Tabela D. 2 - Condições de operação do cromatógrafo para o método de dosagem de consumo de álcoois e formação de laurato de isoamila.

Coluna empacotada de aço inoxidável (80/100 mesh, 6FT, 2,0 mm ID X 1/8 OD, Marca Restek P/N PC13512)				
Padrão Interno (PI): Octanol				
Temperaturas	Rampa de aquecimento: 50 °C por 2 min 70 °C por 2 min em 20 °C/min 120 °C por 3 min 170 °C por 9 min em 25 °C/min duração: 22 min	Ionizador 190 °C	Vaporizador 190 °C	Detector 230 °C
Vazão dos gases: Nitrogênio (25-30 mL/min); Hidrogênio (27 mL/min); Ar sintético (300 mL/min)				
Outras condições: amostra + padrão interno (1:1) e injetar 1 µL				
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)	
1	Hexano	1,43	-	
2	Álcool isoamílico	4,75	27,32	
3	Octanol	10,13	49,96	
4	Laurato de isoamila	15,84	126,17	

Fonte: Própria.

Tabela D.3 - Condições de operação do cromatógrafo para o método de dosagem de consumo de álcoois e formação de oleato de isoamila.

Coluna capilar (TR-FAME 30 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm de espessura de filme, Marca Thermo Scientific)				
Padrão Interno (PI): Octanol				
Temperaturas	Rampa de aquecimento: 40 °C por 1 min 70 °C por 3 min em 20 °C/min 120 °C por 3 min 250 °C por 5 min em 25 °C/min duração: 21 min	Ionizador 190 °C	Vaporizador 190 °C	Detector 230 °C
Vazão dos gases: Nitrogênio (1 mL/min); Hidrogênio (27 mL/min); Ar sintético (300 mL/min)				
Outras condições: amostra + padrão interno (1:1) e injetar 1 µL				
Nº	Composto	Tempo de retenção (min)	Concentração (g/L)	
1	Hexano	1,58	-	
3	Álcool isoamílico	3,17	14,60	
4	Octanol	7,85	10,62	
6	Oleato de isoamila	15,73	16,20	

Fonte: Própria.

Figura D.1 - Cromatograma típico gerado na quantificação dos álcoois (butanol e isoamílico) e ésteres (caprilato de butila e caprilato de isoamila) empregando o método estabelecido.

Fonte: Própria.

Figura D.2 - Cromatograma típico gerado na quantificação do álcool isoamílico e éster laurato de isoamila empregando o método estabelecido.

Fonte: Própria.

Figura D.3 - Cromatograma típico gerado na quantificação do álcool isoamílico e éster oleato de isoamila empregando o método estabelecido.

Fonte: Própria.

A avaliação estatística da recuperação e reprodutibilidade dos métodos estabelecidos é mostrada na Tabela D.4.

Tabela D.4 - Avaliação estatística da recuperação e da reprodutibilidade dos métodos cromatográficos.

Composto	Concentração injetada (g/L)	Concentração recuperada (g/L)	% Recuperação
Butanol	59,50	55,06 ± 1,90	92,54
Álcool isoamílico	77,40	67,97 ± 3,26	87,82
Caprilato de butila	37,00	31,85 ± 1,11	86,08
Caprilato de isoamila	45,40	42,89 ± 1,77	94,47
Álcool isoamílico	27,32	24,32 ± 2,65	89,02
Laurato de isoamila	126,17	121,47 ± 1,65	96,27
Álcool isoamílico	14,60	14,71 ± 0,54	99,00
Oleato de isoamila	16,20	15,15 ± 1,36	93,00

Fonte: Própria.

APÊNDICE E - Especificidade da lipase de *Rhizopus oryzae* com relação a ácidos carboxílicos de cadeia longa saturados e insaturados em meio não aquoso

Estudos referentes a especificidade de lipases para ácidos carboxílicos de cadeia longa saturados e insaturados em meio não aquosos são escassos, sendo encontrados apenas dois artigos na literatura. Por exemplo, Janssen et al (1993) relataram que apesar das frações molares do éster no estado de equilíbrio serem afetadas pelo comprimento da cadeia do ácido carboxílico, nas condições ensaiadas não foram observadas diferenças marcantes entre a especificidade da lipase para ácidos carboxílicos saturados ou insaturados. Por outro lado, Selmi et al. (1989) relataram nenhuma diferença entre os rendimentos de esterificação dos ésteres de esterato (C18:0) ou oleato (C18:1), no entanto, foi verificado redução de 60% no rendimento de esterificação para o ácido linoleico (C18:2), atribuído a problemas de difusão.

Conforme descrito no capítulo 6, a síntese do biolubrificante oleato de isoamila apresentou menor desempenho que o obtido com o ácido láurico (laurato de isoamila), como descrito no capítulo 5. Desta forma, visando esclarecer se tal limitação poderia ser originada da menor atividade da lipase para ácidos carboxílicos insaturados, testes adicionais foram realizados visando investigar a influência do grau de insaturação do ácido carboxílico sobre a atividade de esterificação de lipase de *Rhizopus oryzae*.

Para tanto, a atividade sintética do biocatalisador foi avaliada quantificando o rendimento da esterificação do etanol com os ácidos oleico e esteárico, seguindo a metodologia descrita por Pinto et al. (2014) com pequenas modificações. Uma unidade de atividade enzimática (1IU ou 1U) corresponde à quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de oleato de etila ou estearato por minuto nas condições ensaiadas (50 °C).

A conversão molar de cada ácido em ésteres de etila é exibida na Figura E1, e as atividades de esterificação foram calculadas e exibidas na Tabela E1. Os resultados indicaram que a atividade da lipase de *R. oryzae* para sintetizar o esterato de etila foi 35% maior em relação a formação do oleato de etila.

Embora esse tipo de informação seja dependente da fonte de lipase, os resultados aqui descritos para lipase de *R. oryzae* podem auxiliar no melhor entendimento das variáveis que afetam o progresso das reações de esterificação e servem de base para a continuidade desta linha de pesquisa, que utiliza material de baixo custo para obtenção de ésteres de elevado valor agregado.

Figura E.1 - Progresso da formação do estearato de etila e oleato de etila em reações catalisadas por *R. oryzae* imobilizada em STY-DVB.

Fonte: Própria.

Tabela E.1 - Comparação das atividades de esterificação da lipase *R. oryzae* imobilizada em STTY-DVB em diferentes modelos de reação.

Ácido carboxílico	Atividade de esterificação (U g^{-1})
Ácido oleico	$78,40 \pm 5,54$
Ácido esteárico	$113,30 \pm 3,45$

Fonte: Própria.

REFERÊNCIAS

- JANSSEN, A. E. M; VAN DER PADT, A.; VAN'T RIET, K. Solvent effects on lipase-catalyzed esterification of glycerol and fatty acids. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 42, p. 953, 1993.
- SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 23, p. 182, 1998.
- PINTO, M.C.C., FREIRE, D.M.G., PINTO, J.C. Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, v. 19, p. 12509-12530, 2014.

ANEXOS

ANEXO I

Artigo previamente publicado referente ao Capítulo 4: VILAS BÔAS, R. N. et al. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fúsel como matéria-prima. Química Nova, v. 40, n. 5, p. 541-547, 2017.

SÍNTESE ENZIMÁTICA DO CAPRILATO DE ISOPENTILA UTILIZANDO ÓLEO FÚSEL COMO MATÉRIA-PRIMA

Renata N. Vilas Bôas, Francisco C. Biaggio*, Domingos S. Giordani e Heizir F. de Castro

Departamento de Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, 12602-810 Lorena – SP, Brasil

Recebido em 16/11/2016; aceito em 31/01/2017; publicado na web em 24/03/2017

ENZYMATIC SYNTHESIS OF ISOPENTYL CAPRYLATE USING FUSEL OIL AS FEEDSTOCK. Four commercial lipase preparations immobilized by covalent attachment on epoxy-polysiloxane- β -cyclodextrin were tested as potential biocatalysts to mediate the esterification reaction of isopentanol with caprylic acid in solvent-free medium. Among them, the immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* was the most active biocatalyst, attained ester conversion higher than 80% in 24 h, being selected for subsequent tests using fusel oil as source of isopentanol. An experimental design was performed and the analysis of the results revealed that the formation of the isopentyl caprylate was strongly influenced by the variable molar ratio at 95% of confidence level. The proposed mathematical model allowed predicting that the excess of caprylic acid (molar ratio fusel oil to acid of 1:1.5) and reaction temperature of 45 °C favor the reaction to attain high ester conversion. Sensory evaluation of the flavors profile in relation to all the components involved in the reaction (caprylic acid, fusel oil and esters) showed that the formed esters had distinct aromas from the starting materials, confirming that the changes in flavors occurred before and after esterification reactions.

Keywords: isopentyl caprylate; immobilized lipase; fusel oil; optimization; esterification.

INTRODUÇÃO

Entre os diversos subprodutos gerados pela Indústria Sucroalcooleira, o óleo fúsel apresenta amplo potencial de reaproveitamento devido sua composição rica em alcoóis superiores e elevado volume gerado (120 milhões de litros/ ano).¹

Apesar do seu aproveitamento não atuar diretamente na redução do custo final do álcool, sua utilização como insumo nas indústrias de transformação certamente representa um importante passo para aumentar a eficiência global da produção industrial do etanol.² Atualmente, a taxa de recuperação do óleo fúsel é de apenas 25% do total produzido no país, ou seja, 30 milhões de litros/ ano.³ Possíveis alternativas para o aproveitamento deste subproduto incluem a produção de alcoóis superiores por destilação fracionada,⁴ e síntese de ésteres por via química ou biotecnológica.⁵⁻⁷

Ésteres são componentes importantes de aromas naturais e contribuem na formação e acentuação dos aromas em diversos alimentos.⁸⁻¹¹ Com a demanda crescente de produtos naturais, a indústria de alimentos está interessada no uso da rota biotecnológica para produção de ésteres aromatizantes.¹¹ Desta forma, é crescente o interesse da aplicação de catalisadores bioquímicos em síntese orgânica,⁸⁻¹⁰ entre os quais especial atenção tem sido dedicada às enzimas lipolíticas (lipases e esterases), em função da elevada atividade catalítica exibida em diversos meios não convencionais.^{9,10}

A síntese catalisada por lipases (glicerol éster hidrolases EC 3.1.1.3) de mais de 50 ésteres de aromatizantes já foi descrita na literatura^{8,11} e, em princípio, a reação pode ser conduzida em meio reacional constituído de álcool e ácido carboxílico em presença ou ausência de solventes, resultando em produtividades elevadas e rendimentos quantitativos.^{9,10} Entretanto, são escassos os trabalhos encontrados na literatura referentes à aplicação de lipases na biotransformação dos alcoóis presentes (etanol, 13%; butanol, 15%; isobutanol, 10%; isopentanol, 51%) no óleo fúsel em seus ésteres respectivos.¹²⁻¹⁶ Este fato pode estar associado às dificuldades técnicas envolvidas quando misturas de alcoóis são usadas

em reações de esterificação direta, como competição entre dois ou mais nucleofílicos pelo mesmo sítio ativo da enzima e o elevado teor de água presente nesse material que exige a aplicação de técnicas especiais de desidratação por meio do emprego de sais desidratantes ou peneira molecular para tornar adequado este tipo de substrato às condições de catálise mediada por lipases (baixo teor de água < 500 ppm).^{9,17} Além disso, a presença de teores elevados de alcoóis secundários pode acarretar uma complexidade adicional, tendo em vista que a esterificação de alcoóis secundários é fortemente dependente da fonte de lipase e do tamanho da cadeia do ácido carboxílico.^{7,9} Os rendimentos de esterificação tendem a diminuir com ácidos de tamanho de cadeia curta⁷; sendo os resultados mais baixos obtidos com o ácido acético.¹⁵ Desta forma, a seleção do doador do grupo acila é um fator crucial para uma transformação eficiente do substrato por catálise enzimática. Estudos reportados na literatura demonstram elevados rendimentos de esterificação (> 95%), utilizando ácidos de cadeia carbônica longa (número de carbonos superior a 12) como doador do grupo acila.^{13,14,18,19}

No presente estudo foi proposto avaliar ácido carboxílico de cadeia média (ácido caprílico) como doador do grupo acila na produção de ésteres aromatizantes naturais a partir de óleo fúsel. Em função dos resultados satisfatórios obtidos anteriormente por Santos *et al.*,²⁰ optou-se pela manutenção de sistemas reacionais isentos de solventes. Tais sistemas apresentam inúmeras vantagens, entre as quais se destacam: i) evita problemas de separação, de toxicidade e inflamabilidade dos solventes orgânicos e ii) reduz o custo do produto final. Além disso, a eliminação de solventes é particularmente interessante nas indústrias alimentícias, nas quais existem rigorosas regulamentações para o seu uso.²⁰

Os experimentos foram realizados utilizando fonte de lipase selecionada para esterificação de alcoóis secundários, adotando a metodologia de planejamento estatístico que possibilita verificar a influência das variáveis e suas interações no rendimento de um determinado processo com grande economia de tempo, material e recursos.²¹ Adicionalmente ao controle dos parâmetros de processo foi também utilizado um sensor olfativo artificial para detecção dos compostos voláteis presentes nos produtos formados, utilizando

*e-mail: biaggio@dequi.eel.usp.br

metodologia que permite correlacionar o perfil sensorial das amostras de ésteres obtidas a partir das matérias-primas precursoras no sistema reacional.^{22,23}

PARTE EXPERIMENTAL

Materiais

Foram utilizadas preparações de lipases comerciais de origem microbiana de diferentes fontes, como lipase de *Rhizopus oryzae* (L036P) adquirida da Biocatalysts (Cardiff, Inglaterra) e *Candida rugosa* (Tipo VII); *Pseudomonas fluorescens* e *Burkholderia cepacia* adquiridas da Sigma-Aldrich Chemical (St. Louis, MO, EUA). O óleo fúsel foi gentilmente fornecido pela destilaria (São Martinho S/A - Unidade Iracema, localizada em Iracemápolis - São Paulo) com composição aproximada de 65% de isopentanol, 8% de isobutanol, 0,4% de butanol, 1,5% de propanol, 10% de etanol e 15% de água. Outros reagentes utilizados foram: β -ciclodextrina (Sigma-Aldrich- β CD, 97%), tetraetilortossilicato (Sigma-Aldrich-TEOS, 98%); epícloridrina (Sigma-Aldrich 99%), ácido caprílico (Merck, 97%), isopentanol (Merck, 99%), heptano e hexanol (Vetec), polietilenoglicol – PEG-1.500 (Sinthy), goma arábica em pó pura (Synth), hidróxido de potássio (min. 85%, Cromoline) e azeite de oliva com baixa acidez (Carbonell, adquirido em mercado local). Os padrões (caprilato de butila e caprilato de isopentila) para calibração do método via análise cromatográfica foram obtidos por síntese química de acordo com Urioste *et al.*²⁴ Os ésteres foram purificados por destilação à pressão reduzida e as estruturas químicas confirmadas por análise de Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN¹H), conforme ilustrado no material suplementar (IS). Os espectros foram obtidos no aparelho Varian Mercury 300 MHz. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelo sinal do TMS (Tetrametilsilano – $\delta = 0$) em CDCl₃. Cada espectro foi analisado calculando-se a integração dos números relativos de hidrogênio presente na estrutura química do monoéster de ácido em 0,00-6,00 ppm.

Síntese e ativação da matriz de imobilização das lipases

O suporte híbrido sílica- β -ciclodextrina (SiO₂- β CD) foi sintetizado pela técnica sol-gel utilizando TEOS como precursor e posteriormente ativado com epícloridrina de acordo com técnica descrita por Martin *et al.*,²⁵ fornecendo suporte com as seguintes características texturais: área superficial específica (450,5 m² g⁻¹), volume específico dos poros (0,36 cm³ g⁻¹) e diâmetro médio dos poros 32,09 Å.

Imobilização das lipases no suporte híbrido

A matriz epoxilada (epóxi-SiO₂- β CD) foi utilizada para imobilizar as lipases de diversas fontes empregando para cada grama de suporte ativado (matéria seca) 250 mg de lipase na sua forma livre, e 100 μ L de solução aquosa contendo 5 mg mL⁻¹ de polietilenoglicol (massa molecular 1500). As suspensões contendo enzima e suporte foram mantidas sob agitação a 30 °C por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens sucessivas com hexano para remoção do excesso de umidade.²⁵ Em seguida, os derivados imobilizados foram acondicionados em dessecador sob vácuo para redução da umidade em valores inferiores a 8%. As atividades enzimáticas das lipases imobilizadas foram determinadas pelo método de hidrólise do azeite de oliva, conforme a metodologia modificada por Soares *et al.*²⁶

Tratamento do óleo fúsel

O elevado teor de água originalmente presente no óleo fúsel foi reduzido por meio de peneiras moleculares de 0,32 Å (Silicato de sódio e alumínio) tipo 13 X-BHD Chemicals. Deve ser destacado que não foi utilizada a técnica de destilação fracionada para a remoção de água presente no óleo fúsel devido ao interesse de manter a composição original da mistura dos alcoóis característico do óleo fúsel para ser utilizado como matéria-prima residual nas reações. A concentração de água presente no óleo fúsel foi reduzida de 15% para 0,1%, quantificando o teor de água em titulador automático Karl Fisher (Modelo Koehler AKF5000).

Síntese do caprilato de isopentila

Testes de seleção da lipase

Testes iniciais foram direcionados para a seleção da lipase mais adequada para catalisar reações de esterificação do isopentanol com o ácido caprílico. As reações foram conduzidas em reatores fechados de 100 mL contendo 20 mL de substrato sem adição de solventes em proporção equimolar. As misturas foram incubadas com as diferentes preparações de lipase imobilizada em SiO₂- β CD na proporção de 350 unidades de atividade por grama de meio reacional, por um período máximo de 48 h, com agitação magnética (150 rpm) a 45 °C. Amostras foram retiradas durante o progresso da reação (12, 24 e 48 h) para quantificação da concentração dos materiais de partida e cálculo da conversão em éster baseada no consumo do isopentanol.

Planejamento fatorial

A influência das variáveis: razão molar (X₁) e temperatura (X₂) na síntese do caprilato de isopentila a partir do óleo fúsel e ácido caprílico empregando a preparação de lipase imobilizada selecionada anteriormente foi determinada por um planejamento composto de face centrada 2² e pontos centrais. As reações foram conduzidas em reatores fechados de 100 mL contendo 20 mL de substrato composto de óleo fúsel previamente desidratado e ácido caprílico, sem adição de solvente em razões molares entre álcool/ácido de 1:0,5 a 1:1,5 (a proporção de óleo fúsel adicionado foi calculada com base na concentração de isopentanol presente neste subproduto). As misturas foram incubadas com a preparação de lipase imobilizada, na proporção de 10% (m/m) em relação à massa total dos reagentes envolvidos no meio reacional, por um período máximo de 48 h, com agitação magnética (150 rpm) na faixa de temperatura entre 40 a 50 °C. Todos os experimentos foram efetuados de maneira randômica. Como variável resposta foi considerada a conversão em caprilato de isopentila. Nesta série de experimentos a formação do caprilato de isobutila não foi avaliada em função da baixa concentração do isobutanol presente no óleo fúsel ($\approx$ 8%). A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa Statistica versão 13.

Determinação dos produtos formados e reagentes consumidos

A formação dos produtos (caprilato de isobutila e caprilato de isopentila) e o consumo dos alcoóis (isobutanol e isopentanol) foram determinados em cromatógrafo a gás (Varian – Modelo CG 3800 Varian, Inc., Palo Alto, CA, EUA) equipado com uma coluna empacotada de aço inoxidável (80/100 mesh, 6ft, 2,0 mm ID X 1/8 OD) e detector de ionização em chama (FID). A temperatura do detector foi fixada em 230 °C e a do injetor em 190 °C. Nitrogênio foi usado como gás de arraste num fluxo de 10 mL min⁻¹ e os fluxos dos gases de arraste para alimentação do detector foram: 30 mL min⁻¹ de H₂ e 300 mL min⁻¹ de ar sintético. As condições operacionais estabelecidas foram: temperatura da coluna ajustada para 60 °C durante 3 min e

depois programada a 90 °C por 3 min numa taxa de 15 °C min⁻¹ seguida de aquecimento até 120 °C numa taxa de 20 °C min⁻¹ e mantida em 120 °C por 6 min. Como padrão interno foi utilizado *n*-hexanol (50 g L⁻¹) em heptano. A coleta e análise de dados foram realizadas utilizando os dados gerados pelo Sistema Galaxie versão 1.9. O teor de ácido caprílico foi determinado por titulação de alíquotas diluídas em etanol, empregando solução alcoólica de KOH 0,05 mol L⁻¹ e fenolftaleína como indicador.

Análise sensorial por nariz eletrônico

A coleta de dados efetuada pelo nariz eletrônico (modelo Cyranose 320TM, marca Smiths Detection, fabricado por Sensigent INC, EUA) se baseia na sucção da amostra pelo headspace e exposição a um conjunto de 32 sensores que, em consequência, têm alteradas as suas resistências elétricas, as quais são registradas, formando o perfil olfativo da amostra. Para a caracterização dos componentes estudados, utilizou-se a vazão de 180 cm³ min⁻¹ para a sucção de ar e de 50 cm³ min⁻¹ para o headspace, com tempos de 10s e 60s, respectivamente. Foram acondicionados 5 mL de amostra para cada componente (ácido caprílico, óleo fúsel e ésteres formados na síntese) separadamente em 10 recipientes e realizadas 10 leituras para cada amostra. O programa utilizado para estabelecer as condições de análise foi o PCnose. O método estatístico adotado para análise dos resultados foi o PCA (Principal Components Analysis), que permite a redução do perfil olfativo a três parâmetros de maior significância das alterações produzidas nos sensores, possibilitando a geração de um gráfico tridimensional para visualização do resultado.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Seleção da lipase para síntese do caprilato de isopentila

A imobilização das quatro fontes de lipase *Candida rugosa*, *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens* e *Rhizopus oryzae* no suporte híbrido SiO₂-βCD forneceu elevada eficiência (> 60%), demonstrando que o procedimento de imobilização foi efetuado com sucesso, resultando em derivados imobilizados com elevadas atividades hidrolíticas variando na faixa de 2020 U g⁻¹ e 3714 U g⁻¹ (Tabela 1). O teor de água dos derivados imobilizados foi inferior a 8% visando reduzir a influência da água no meio reacional.

Tabela 1. Atividade enzimática (Ug⁻¹) e teor de umidade das preparações de lipases imobilizadas em SiO₂-βCD

Enzima	Atividade catalítica* (Ug ⁻¹)	Teor de água (%)
<i>Candida rugosa</i>	2802 ± 43	4,94
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2020 ± 69	7,29
<i>Burkholderia cepacia</i>	2090 ± 70	6,82
<i>Rhizopus oryzae</i>	3714 ± 35	7,68

*Método de hidrólise do azeite de oliva (emulsão 50%; pH 7,0; temperatura 37 °C).

Para selecionar o derivado imobilizado mais adequado na formação de ésteres secundários foram mantidas fixas as condições reacionais, incluindo o carregamento catalítico (350 unidades de atividade por grama de meio reacional). Os valores de conversão em éster para diferentes tempos de incubação (12, 24 e 48h) dispostos na Figura 1 indicam que todas as lipases testadas apresentaram potencial para catalisar a reação de esterificação, alcançando conversões superiores a 70% em 24 h de reação.

As lipases de *Pseudomonas fluorescens* e de *Burkholderia cepacia* foram menos eficientes. Entretanto, ao usar a preparação de *P. fluorescens*, obteve-se conversão mais elevada alcançando valores médios de 83,78% ± 7,43 em 48 h. Verificou-se que a lipase de *B. cepacia*, nas condições testadas, apresentou tendência de hidrolisar o éster após 24 h de reação, sendo a conversão em éster reduzida de 77,47% ± 1,98 para 70,19% ± 7,76.

Conversões similares foram obtidas pelas lipases de *Candida rugosa* e *Rhizopus oryzae*, que forneceram valores de conversão superiores a 80% em 24 h de reação. O progresso da reação catalisada por *R. oryzae* confirmou a potencialidade desta lipase para mediar reações em meio orgânico (esterificação e interesterificação), conforme anteriormente reportado.²⁷

Figura 1. Conversão em éster durante a síntese do caprilato de isopentila mediada por diferentes fontes de lipases imobilizadas em SiO₂-βCD nos tempos 12, 24 e 48 h (condições: temperatura = 45 °C, razão equimolar álcool/ácido e meio isento de solvente)

Desta forma, selecionou-se esta preparação de lipase para testes subsequentes. Adicionalmente esta lipase na forma imobilizada apresentou elevado tempo de meia-vida quando utilizada em processos descontínuos (com reciclo do sistema imobilizado)²⁸ e contínuos.²⁹ Propriedades adicionais da lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-βCD revelaram os seguintes parâmetros na hidrólise do azeite de oliva: $K_m = 852 \text{ mmol L}^{-1}$, $V_{max} = 52961 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ e estabilidade térmica a 50 °C = 8,0 h.

Otimização da síntese de caprilato de isopentila

Tendo selecionado a lipase *R. oryzae* como a fonte enzimática mais efetiva na síntese de caprilato de isopentila, testes subsequentes foram efetuados substituindo o isopentanol de grau analítico por óleo fúsel. As condições testadas na síntese de ésteres a partir do isopentanol presente no óleo fúsel com o ácido caprílico estão apresentadas na Tabela 2, juntamente com os resultados obtidos expressos em conversão em éster para diferentes tempos de incubação (24 e 48 h).

Verifica-se, na Tabela 2, que utilizando ácido caprílico como doador do grupo acila, o biocatalisador selecionado foi efetivo na formação de ésteres em meio isento de solventes, alcançando elevadas conversões (> 50%) nas primeiras 24 h de reação (ensaios 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 e 11). Entretanto, constatou-se que para substratos contendo excesso de álcool (razão molar álcool: ácido= 1:0,5) foram obtidas conversões inferiores a 20%, independente da temperatura de incubação (ensaios 1, 3 e 5). Em 48 h de reação, observa-se que apenas as reações conduzidas em substratos contendo excesso de

Tabela 2. Matriz experimental e resultados obtidos no planejamento composto de face centrada 2² utilizado para determinar as condições otimizadas da reação de esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel catalisada pela lipase de *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-βCD

Ensaio	Variável codificada		Variável real		Variável resposta (conversão em éster %)	
	X ₁	X ₂	Razão Molar (álcool: ácido)	Temperatura (°C)	24h*	48h
1	-1	-1	1:0,5	40	17,10	33,77
2	+1	-1	1:1,5	40	74,41	85,18
3	-1	+1	1:0,5	50	13,60	29,82
4	+1	+1	1:1,5	50	89,23	88,89
5	-1	0	1:0,5	45	17,10	33,77
6	+1	0	1:1,5	45	85,86	90,91
7	0	-1	1:1	40	58,36	62,78
8	0	+1	1:1	50	62,15	62,46
9	0	0	1:1	45	63,77	63,77
10	0	0	1:1	45	66,17	63,17
11	0	0	1:1	45	57,19	61,98

*Valores considerados para a análise estatística.

ácido (razão molar álcool: ácido=1:1,5) alcançaram conversões superiores a 85% (ensaios 2, 4 e 6), independente da temperatura de incubação. Os dados obtidos indicam, de maneira geral, que o excesso de ácido garante a formação do complexo enzima-grupo acila para posterior reação com o álcool, conduzindo assim à formação do éster, e reduzindo, desta forma, a competição entre os aceptores, parâmetro essencial para a cinética de uma reação de esterificação.^{9,10} Isto sugere que a síntese de caprilato de isopentila catalisada pela lipase *R. oryzae* imobilizada em SiO₂-βCD pode ser limitada pela concentração de ácido caprílico, sugerindo a necessidade de se trabalhar com excesso deste reagente.

As baixas conversões obtidas nas reações contendo excesso de álcool podem ser também correlacionadas com a polaridade global do sistema reacional determinada pelo parâmetro log *P*, definido como o coeficiente de partição em um sistema bifásico padrão octanol/água para compostos orgânicos.³⁰ De acordo com a literatura, os valores tabulados de log *P* para o isopentanol é da ordem de 1,28, enquanto o ácido caprílico possui um valor = 3,05. Desta forma, nos sistemas reacionais contendo excesso de óleo fúsel, a polaridade mais elevada do substrato pode modificar a interação do álcool com a água essencial ao redor da enzima limitando a migração do ácido para a fase sólida da enzima, resultando na redução da atividade da enzima.^{7,9}

Esses resultados estão de acordo com o descrito por Sun *et al.*,⁷ referente aos efeitos adversos causados pela elevada polaridade do óleo fúsel quando adicionado em meios reacionais, notadamente para meios contendo óleo fúsel em excesso.

Considerando os valores obtidos ao final de 24 h de reação, o efeito individual dos fatores experimentais e de suas interações sobre a conversão em éster foi avaliada estatisticamente utilizando o programa Statistica versão 13 (Tabela 3).

As estimativas dos efeitos, erros-padrão, valor de *p* e valor de *t* para a resposta analisada mostraram que as variáveis linear (X₁) e quadrática (X₁²) (razão molar) foram estatisticamente significativas para um nível de confiança de 95%, indicando que excesso de ácido ocasiona maior consumo de álcool e consequentemente maior formação do éster. Verifica-se ainda que o efeito da variável temperatura (X₂) não foi estatisticamente significativo ao nível de 95% de confiança, sugerindo que esta variável não exerce influência significativa na formação do éster. Entretanto, a interação X₁ e X₂ foi estatisticamente significativa para um nível de confiança de 95%, demonstrando que a

Tabela 3. Estimativa dos efeitos para a conversão em éster de acordo com o planejamento fatorial 2² com face centrada para um nível de confiança 95%

Variável	Efeito	Erro Padrão	Valor t	p
Média	62,53	1,56	39,96	0,0000*
(X ₁) Razão Molar	67,23	2,49	26,99	0,0000*
(X ₁ ²) Razão Molar	-22,60	3,83	-5,89	0,0019*
(X ₂) Temperatura	5,03	2,49	2,02	0,0990
X ₂ ²) Temperatura	-5,05	3,83	-1,31	0,2442
X ₁ . X ₂	9,16	3,05	3,00	0,0299*

**p*: efeitos significativos para valores de *p*<0,05.

temperatura quando combinada com a razão molar exerce influência significativa na conversão em éster (%).

Os efeitos principais para a conversão foi ajustado por análise de regressão múltipla para um modelo polinomial e a melhor função ajustada pode ser descrita pela Equação 1, em que: *Y* é a variável resposta (conversão em éster %) e X₁ e X₂ representam os valores codificados para razão molar e temperatura, respectivamente.

$$Y = 62,53 + 33,61X_1 - 11,30X_1^2 + 4,58X_1X_2 \quad (\text{Eq. 1})$$

A significância estatística dos efeitos principais e da interação dos fatores sobre a formação do caprilato de isopentila foi realizada por análise de variância, como mostrado na Tabela 4.

Por meio dos resultados obtidos (significância de 95% do modelo *p*<0,05), pode-se concluir que há relação entre as variáveis e que análise de variância proporcionou um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. Verifica-se ainda pelo valor de R² de 0,9936 que a equação ajustada foi capaz de explicar 99,36% da variabilidade dos valores experimentais.

Desta forma, considera-se que o modelo estatístico obtido foi adequado para descrição da conversão em caprilato de isopentila em função da razão molar ácido/álcool e da temperatura, obtendo-se a superfície de resposta apresentada na Figura 2.

A observação da Figura 2 indica que a conversão em éster (%) foi dependente da razão molar (álcool/ácido) e da interação

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para a variável resposta conversão em éster (%)

Variável	Soma quadrática	Grau de liberdade	Média quadrática	F _{cal}	p<0,05
X ₁	6780,48	1	6780,48	728,71	0,0000*
X ₁ ²	323,69	1	323,69	34,78	0,0019*
X ₂	38,05	1	38,05	4,08	0,0990
X ₂ ²	16,19	1	16,19	1,74	0,2442
X ₁ X ₂	83,90	1	83,90	9,01	0,0299*
Erro puro	46,52	5			
R ²	0,9936				

F: teste estatístico de comparação da variância nos ensaios, permitindo a avaliação da qualidade do ajuste do modelo. *Significativo ao nível de significância de 95% (p<0,05).

Figura 2. Superfície de resposta de acordo com a equação predita para conversão em caprilato de isopentila (%) em função da razão molar álcool/ácido e temperatura

temperatura com a razão molar. Portanto, com o aumento da razão molar (álcool/ácido), a conversão aumenta gradativamente. Verifica-se ainda que para se obter elevadas conversões (> 80%) em 24 h de reação, a razão molar entre álcool e ácido deve ser maior que 1:1,5 e a temperatura de incubação maior que 40 °C. O experimento

Figure 3. Perfil de consumo do isobutanol (■) e isopentanol (●) na formação dos ésteres caprilato de isobutila (□) e caprilato de isopentila (○) na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido caprílico nas condições estimadas pelo planejamento fatorial: razão molar (álcool/ácido) de 1:5 e temperatura de 45 °C

conduzido nas condições previstas pelo modelo (razão molar entre álcool/ácido de 1:5 e temperatura de 45 °C) indicou rápido consumo dos reagentes, atingindo conversões superiores a 82% em 24 h de reação, confirmando dessa forma o modelo matemático obtido (Figura 3).

Os resultados obtidos quando comparado aos dados descritos na literatura indicam comportamentos diferenciados em função da diversidade das fontes de lipases, polaridade do grupo acila, razões molares e tempo de reação (Tabela 5). A esterificação de ácidos carboxílicos com álcoois catalisada por lipase é uma estratégia comum para a acilação de álcoois primários, enquanto ainda permanece uma tarefa complexa para álcoois secundários. Neste caso específico, a seleção de um doador do grupo acila apropriado influencia a reatividade da enzima significativamente.

Nos trabalhos identificados na literatura são descritos a utilização do óleo fúsel proveniente da fermentação de milho,³¹ e proveniente da fermentação do caldo de cana-de-açúcar.^{12,13,32} Apesar da diferença entre as unidades produtoras, bem como das concentrações dos álcoois constituintes do óleo fúsel, isopentanol, etanol e isobutanol sempre se apresentaram em maior proporção.

Macedo e Pastore¹² testaram cinco lipases microbianas de *Geotrichum* sp., *Alcaligenes* sp., *Aspergillus* sp. 1068, *Aspergillus* sp. 1099 e *Rhizopus* sp. quanto à capacidade de catalisar a síntese de ésteres formadores de aroma por esterificação em meio isento de solvente orgânico utilizando óleo fúsel como precursor. A natureza da enzima, assim como o tamanho da cadeia dos ácidos afetaram as

Tabela 5. Conversão em ésteres relatados por vários autores e no presente trabalho, obtidos pela esterificação do isopentanol proveniente do óleo fúsel com ácidos carboxílicos com lipases de diferentes fontes e sob diferentes condições reacionais

Enzima	Solvente	Materiais de partida	Conversão em éster (%)	Tempo de reação (h)	Referência
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido propílico /isopentanol	72	24	Macedo,Pastore ¹²
Lipozyme TL IM	heptano	ácido láurico /isopentanol	92	8	Castro <i>et al.</i> ¹³
Lipozyme TL IM	hexano	ácido butírico /isopentanol	93	18	Anschau <i>et al.</i> ¹⁴
Novozym® 435	isento	ácido acético /isopentanol	75	8	Guvenc <i>et al.</i> ¹⁵
<i>Candida cylindracea</i>	hexano	ácido butírico /isopentanol	65,8	48	Welsh; Williams ³¹
		ácido acético /isopentanol	46,4	48	
Novozym® 435	isento	ácido oleico /isopentanol	99,8	6	Dormo <i>et al.</i> ¹⁶
<i>Rhizopus oryzae</i>	isento	ácido caprílico/isopentanol	82	24	Este trabalho

conversões obtidas. Os resultados mais elevados foram obtidos na síntese do laurato de isoamila (88%) e propionato de isoamila (72%) utilizando a lipase de *Rhizopus* sp. em 24 h de incubação, seguido de 82% de conversão na síntese de acetato de isopropila por *Alcaligenes* sp. em 24 h de incubação. O desempenho superior reportado por De Castro *et al.*,¹³ empregando um sistema reacional composto de ácido láurico e óleo fúsel (conversões de 92% em 8 h de reação) pode ser relacionado ao biocatalisador utilizado (Lipozyme) uma preparação de lipase de *Mucor miehi* imobilizada em resina de troca iônica disponível comercialmente.¹⁷ Este biocatalisador é considerado um dos mais adequados para mediar reações de esterificação devido ao levado poder do suporte em adsorver a água formada durante a reação de síntese, mantendo desta forma condição adequada de baixo teor de água no meio reacional, reduzindo a ocorrência da reação inversa de hidrólise.¹⁷

Resultados similares foram obtidos por Anschau *et al.*,¹⁴ utilizando também Lipozyme TL IM na síntese de butirato de isopentila a partir do óleo fúsel e ácido butírico em quantidades equimolares na presença de hexano a 30 °C. Nessas condições foram relatados 93% conversão e concentração do butirato de isopentila de 1,0 mol L⁻¹ em 18 horas de reação.

Guvênç *et al.*,¹⁵ utilizando o sistema reacional ácido acético e isopentanol reportaram resultados de conversão de 75% (3,40 mol L⁻¹) em 8 h na reação catalisada pela lipase imobilizada da *Candida antarctica* (Novozym® 435) em meio isento de solvente, e verificaram que variável mais significativa foi a razão molar ácido/álcool (0,2:0,8). Ainda Welsh e Williams,³¹ reportaram produção máxima de uma mistura de éster de ácido butírico (0,62 mol L⁻¹; conversão = 65,8%) e éster de ácido acético (0,052 mol L⁻¹; conversões = 46,4%) em 48 h de reação utilizando a lipase *Candida cylindracea*. Dormo *et al.*¹⁶ construíram um sistema com pervaporação para ser utilizado na remoção da água produzida na reação de esterificação do óleo fúsel com ácido oleico catalisada pela lipase Novozym® 435. Nas condições otimizadas o sistema foi adequado para obter elevadas conversões (99,8%) em 6 h de reação.

Desta forma, verifica-se que os resultados descritos no presente trabalho se comparam favoravelmente com os descritos na literatura, em termos de conversão em éster nas condições empregadas (ausência de solventes, utilização de suporte não comercial e ausência de estratégia para remoção da água formada como subproduto).

Avaliação sensorial dos ésteres formados durante as reações de esterificação

Além da pureza das amostras e teor do componente de interesse (éster), diversas características físico-químicas e sensoriais são fundamentais para a aceitação de um produto pelo consumidor. Estas características são comumente avaliadas por técnicas de análise sensorial. A avaliação sensorial é uma medida qualitativa baseada em informações recebidas pelos sentidos humanos.²³ Esta medida é muitas vezes realizada em painéis de análise sensorial, nos quais pessoas são empregadas para avaliar as características do produto.^{33,34} Métodos sensoriais de medida, no entanto, apesar de serem muito importantes e largamente empregados, parecem perder a precisão desejável em pesquisa científica em função da variabilidade inerente à avaliação individual de cada pessoa envolvida. Assim, o emprego de equipamentos capazes de realizar medidas mais objetivas e que possam pelo menos complementar a análise tradicional na avaliação da qualidade de produtos alimentícios é desejável. Neste caso, o uso de sensor olfativo artificial mostra-se como uma técnica promissora, pois permite detectar os diferentes aromas presentes no produto final, bem como monitorar a uniformidade e consistência dos aromas formados durante o processo.³⁴ Desta forma, os aromas dos três componentes,

ácido caprílico, óleo fúsel e ésteres formados pela esterificação do ácido caprílico com óleo fúsel foram avaliados pelos sensores gerando o perfil mostrado na Figura 4.

Figura 4. Perfil dos aromas dos ésteres obtidos (quadrado vermelho) e dos materiais de partida na esterificação do ácido caprílico (círculo preto) com óleo fúsel (losango verde)

O perfil permite a comparação dos aromas entre os materiais de partida e os produtos formados nas sínteses de ésteres. Verifica-se que os ésteres formados apresentaram aromas diferentes dos materiais de partida. Os ésteres são representados na cor vermelha, na região central da figura, ao seu lado esquerdo tem-se o ácido caprílico representado na cor preta, e ao seu lado direito tem-se o óleo fúsel na cor verde. Desta forma, é possível afirmar que ocorreram mudanças nos aromas dos materiais de partida antes e após as reações de esterificação.

Verifica-se ainda que o perfil do aroma referente ao óleo fúsel apresentou grande espalhamento, o que pode estar associado à composição mista de alcoóis presentes nesta matéria-prima. O mesmo comportamento foi observado para os aromas dos ésteres formados, porém em menor grau. Por outro lado, este comportamento não foi observado no caso do ácido caprílico por se tratar de reagente puro. Os componentes (1, 2 e 3) explicam juntos 96,68% das variações ocorridas entre as amostras, demonstrando que os sensores discriminaram as amostras satisfatoriamente.

CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como enfoque sintetizar ésteres a partir da matéria-prima residual óleo fúsel utilizando lipases como catalisadores e como doador do grupo acila o ácido caprílico. Mediante testes de seleção de fontes de lipases microbianas, foi selecionada a lipase *R. oryzae* com potencial para aplicação na síntese do caprilato de isopentila resultando em elevadas conversões em 24 h de reação. As condições reacionais da síntese de ésteres utilizando óleo fúsel foram estabelecidas por planejamento experimental, avaliando o efeito das variáveis: temperatura e razão molar ácido/álcool. A análise dos resultados revelou que a formação do caprilato de isopentila foi influenciada somente pela variável razão molar ao nível de 95% de confiança. O modelo matemático proposto permitiu prever as condições que favorecem o alcance de elevados rendimentos de formação do éster, sendo a reação maximizada (82% em 24 h) para meios reacionais constituídos de óleo fúsel e ácido caprílico na razão molar de 1:5 e temperatura de 45 °C. O perfil sensorial efetuado pelo nariz eletrônico permitiu uma comparação dos aromas entre materiais de partida e os produtos formados, sendo constatado que os ésteres formados apresentaram aromas bem distintos dos materiais de partida, sugerindo que ocorreram mudanças nos aromas dos materiais de partida antes e após as reações de esterificação.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros de RMN¹H, bem como a análise das estruturas dos padrões cromatográficos utilizados neste trabalho, estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro concedido pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

- Calam, A.; Solmaz, H.; Uyumaz, A.; Polat, S.; Yilmaz, E.; İçingur, Y. J.; *Energy Inst.* **2015**, 88, 3, 258.
- Berger, R. G.; Krings, U.; Zorn, H. In *Food Flavour Technology*; Taylor, A. J., Linforth, R. S. T., eds.; Wiley-Blackwell: Oxford, 2010. p. 89-115.
- Ferreira, M. C.; Meirelles, A. J. A.; Batista, E. A. C.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2013**, 52, 2336.
- Basso, L. C.; Basso, T. O.; Rocha, S. N. In *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*; Bernardes, M. A. S., eds.; Intech: Croatia, 2011, pp. 85-100.
- Mhetras, N.; Patil, S.; Gokhale, D.; *Indian J. Microbiol.* **2010**, 50, 432.
- Sun, J.; Chin, J. H.; Zhou, W.; Yu, B.; Curran, P.; Liu, S. Q.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2012**, 89, 1991.
- Sun, J.; Yu, B.; Curran, P.; Liu, S. Q.; *Food Chem.* **2013**, 141, 2828.
- Khan, N. R.; Rathod, V. K.; *Process Biochem.* **2015**, 50, 1793.
- Stergiou, P. Y.; Foukis, A.; Filippou, M.; Koukouritaki, M.; Parapouli, M.; Theodorou, L. G.; Hatziloukas, E.; Afendra, A. M.; Pandey, A.; Papamichael, E.; *Biotech. Advances* **2013**, 31, 1846.
- Choi, J.; Han, S.; Kim, H.; *Biotechnol. Adv.* **2015**, 33, 1443.
- Dhake, K. P.; Thakare, D. D.; Bhanage, B. M.; *Flavour Fragr. J.* **2013**, 28, 71.
- Macedo, G. A.; Pastore, G. M.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **1997**, 17, 115.
- De Castro, H. F.; Moriya, R. Y.; Oliveira, P. C.; Soares, C. M. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, 77/79, 827.
- Anscha, A.; Aragão, V. C.; Porciuncula, B. D. A.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M.; *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, 22, 2148.
- Güvenç, A.; Kapucu, N.; Kapucu, H.; Aydogan, O.; Mehmetoglu, U.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 778.
- Dormo, N.; Belafi-Bako, K.; Bartha, L.; Ehrenstein, U.; Gubicza, L.; *Biochem. Eng. J.* **2004**, 21, 229.
- Castro, H. F.; Anderson, W. A.; *Quim. Nova* **1995**, 18, 544.
- Rajendran, A.; Palanisamy, A.; Thangavelu, V.; *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2009**, 52, 207.
- Bruno, L. M.; de Lima Filho, J. L.; Melo, E. H. M.; de Castro, H. F.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2004**, 113, 189.
- Santos, J. C.; Bueno, T.; Da Rós, P. C. M.; De Castro, H. F.; *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **2007**, 82, 956.
- Rodrigues, M. I.; Iemma, A. F.; *Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos*, 1 ed., Editora Casa do Pão: Campinas, 2005, 326p.
- Giordani, D. S.; Siqueira, A. F.; Silva, M. L. C. P.; Oliveira, P. C.; De Castro, H. F.; *Energ. Fuel* **2008**, 22, 2743.
- Röck F.; Barsan N.; Weimar U.; *Chem. Rev.* **2008**, 108, 705.
- Urioste, D.; Castro, M. B. A.; Biaggio, F. C.; De Castro, H. F. *Quim. Nova* **2008**, 31, 407.
- Martin, L. S.; Santos, F. D.; Oliveira, P. C.; De Castro, H. F.; *XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, Fortaleza, Brasil, 2016.
- Soares, C. M. F.; De Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, 77, 745.
- Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Silva, J. L.; De Castro, H. F.; Santos, J. C.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, 160, 1146.
- Paula, A. V.; Nunes, G. F.; De Castro, H. F.; Santos, J. C.; *Ind. Eng. Chem. Res.* **2015**, 54, 1731.
- Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Osório, N. M.; Santos, J. C.; De Castro, H. F.; Ferreira-Dias, S. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2015**, 117, 608.
- Laane, C.; Boeren, S.; Vos, K.; Veeger, C.; *Biotechnol. Bioeng.* **1987**, 30, 81.
- Welsh, F. W.; Williams, R. E. J.; *Food Sci.* **1989**, 54, 1565.
- De Castro, H. F.; Moriya, R. Y.; Ribeiro, R. R.; In: *XVII Simpósio Ibero-Americano de Catálise*, FEUP Edições: Porto, 2000, 1, 793.
- Meilgaard, M. C.; Carr, B. T.; Civille, G. V.; *Sensory evaluation techniques*; CRC press, 2006.
- Tiggemann, L.; Ballen, S.; Bocalon, C.; Graboski, A. M.; Manzoli, A.; Herrmann, P. P. S.; Steffens, J.; Valduga, E.; Steffens, C.; *J. Food Eng.* **2016**, 180, 16.

ANEXO II

Manuscrito previamente submetido referente ao Capítulo 5: VILAS BÔAS, R. N. et al. 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, MS JBB-D-18-00419.

Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil

Renata N. Vilas Bôas, Annie A. Ceron, Heitor B. S. Bento, Heizir F. de Castro*

Engineering School of Lorena, University of São Paulo

12.602-810 Lorena – SP, Brazil

*Corresponding author

Email: heizir@dequi.eel.usp.br

ABSTRACT

Five commercial lipase preparations immobilized on epoxy-polysiloxane-hydroxyethylcellulose were tested as potential biocatalysts to mediate the esterification reaction of isoamyl alcohol with lauric acid in a solvent-free medium. Among them, the immobilized lipase from *Rhizopus oryzae* was the most active biocatalysts, attained high ester yield (81.26%) in 24 h, being selected for subsequent tests using fusel oil as a source of isoamyl alcohol under batch and continuous runs. Under batch conditions, no adverse effect was found when pure isoamyl alcohol was replaced by fusel oil. However, under continuous runs, the selected biocatalyst was found to have limited performance (half-life time = 173 h) and the average ester productivity was only $277.8 \pm 19.3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$. These results can be credited to the high affinity of the hybrid matrix for the water formed as a by-product, modifying the substrate interaction with the essential water around the enzyme limiting the substrate migration to the solid phase and thereby reducing the enzyme activity. By replacing the hybrid support for a higher hydrophobic matrix such as commercial copolymer styrene-divinylbenzene it was possible to attain a stable operation, achieving an average ester productivity of $794.43 \pm 66.04 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ and increasing the half-life time to 285 h. Further productivity incremental ($1598.68 \pm 135.79 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$) was also attained by using higher substrate loading. This process shows to be an attractive alternative to bulk chemical routes to satisfy increasing commercial demands for isoamyl laurate an essential emollient in the cosmetic industry.

Keywords: isoamyl laurate, immobilized lipase, fusel oil, esterification, batch processes, continuous processes

1. INTRODUCTION

Among the various by-products generated by the sugarcane industry, fusel oil has an excellent potential for reusing due to its composition rich in higher alcohols and generated volume (120 million liters/year) [1,2]. Higher alcohols are those consisting of more than two carbon atoms such as isoamyl, isobutyl, propyl, propyl and butyl alcohols [1]. Fusel oil is dark green in color and has a very unpleasant odor, which limits its direct utilization as a solvent [3,4] though some authors have indicated its addition to diesel fuel or gasoline to improve the cetane index and octane number, respectively [3]. Some applications include burning it in boilers to raise steam or burn within a biomass boiler to assist with the combustion of spent grains [5]. The fusel oil can also be used as feedstocks in esterification reactions resulting in a variety of esters depending on the acyl donor such as acetic acid [6]; butyric acid [7]; caprylic acid [8]; lauric acid [9] and oleic acid [10].

Esters are essential components of flavor in foods, beverages, cosmetics, and lubricants. Isoamyl esters, mainly isoamyl acetate, have great importance in the food industry (74000 kg/year) due to their strong aroma of banana [6,11], while isoamyl laurate is widely used to help keep pigments dispersed in makeup products because it enhances the spreadability of products [11,12].

Traditional esterification processes make use of strong acid catalysts at high temperatures to favor ester production; unfortunately, these conditions often produce undesirable byproducts that must be removed by energy-intensive purifications [13]. In contrast, enzyme-catalyzed reactions have become a valuable alternative to overcome those restraints, providing a catalyst able to operate under mild reaction conditions with reduced formation of byproducts and beyond that meets the green chemistry criteria [14,15,16]. Among the enzymes applied in biotechnological processes, lipases (triacylglycerol hydrolase,

EC 3.1.1.3) are the most efficient biocatalysts used for ester synthesis mostly because of its high catalytic activity in organic media [17]. As regards the high-cost limitations of the industrial use of enzymes, the immobilization technique arises as an efficient tool, which allows the catalyst reuse by easy separation, besides they enable its operation in several types of reactors, therefore enhancing productivity and reducing costs [18,19]. Furthermore, the enzymatic synthesis of esters has other economic advantages, since the product generated by this route can be characterized as a green product, which considerably increases its market value [19, 20]. “Green” refers to the process used to convert starting materials into a finished ingredient. Today, buyers not only care about the ingredients inside their favorite products, but they also care about the impact that manufacturing these products has on the environment. Many consumers prefer to purchase environmentally friendly products, especially for their personal care and home needs [20].

The present study aimed to synthesize isoamyl laurate ester from low-cost raw material (fusel oil) using lipase as a catalyst. Commercial production of esters usually takes place in a stirred tank reactor. However, its use is limited in enzyme-catalyzed ester synthesis because of mechanical instability of the immobilized lipase. This problem can be overcome by using packed bed reactors, which comprise a column packing with an immobilized enzyme [21]. Many studies have been already carried out on the transfer of synthesis methodologies in batch reactors to a continuous flow system, and numerous compounds have been successfully synthesized in these devices [21, 22, 23]. The system has low energy consumption and lower reactor volume due to the high enzyme/ substrate ratio compared to a conventional batch reactor [24]. However, packed bed reactors usually show limit performance in the presence of high-molecular-weight and high-viscosity reactants, such as in the case of synthesis of isoamyl laurate [25]. Therefore, in the present study attention was paid to establish the

reaction conditions to obtain isoamyl laurate using both reactor configurations under batch and continuous mode. The influence of the immobilizing support was taken into consideration to reduce the inhibition of the water formed as a byproduct.

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Materials

Microbial lipases from different sources, such as *Candida rugosa* (LCR); *Pseudomonas fluorescens* (LAK); *Burkholderia cepacia* (LBC) and *Penicillium camembertii* (LG) were acquired from Sigma-Aldrich. The lipase of *Rhizopus oryzae* (LRO) was bought from Biocatalysts (Cardiff, UK). These enzymes were obtained in a free form and later immobilized on hybrid support silica-hydroxyethylcellulose following methodology previously [26]. Fusel oil was gently supplied by the distillery (São Martinho S/A - Iracema Unit, located in Iracemápolis - São Paulo) with the approximation of 65% isoamyl alcohol, 8% isobutyl alcohol, 0.4% n-butyl alcohol, 1.5% n-propyl alcohol, 10% ethyl alcohol and 15% water. Other reagents used were: hydroxyethylcellulose (Sigma-Aldrich-97%), Diaion HP-20 resin (Sigma-Aldrich), tetraethylorthosilicate (Sigma-Aldrich-TEOS, 98%); epichlorohydrin (Sigma-Aldrich 99%), lauric acid (Cromoline, 98%), isoamyl alcohol (Merck, 99%), heptane and hexanol (Vetec), isooctane (Cromoline), polyethyleneglycol-PEG-1500 (Sinthy), gum arabic (Synth), potassium hydroxide (min 85%, Cromoline) and olive oil with low acidity (Carbonell, purchased in the local market). The standard isoamyl laurate for calibration method via chromatographic analysis was obtained by chemical synthesis according to Vilas Bôas et al. [8].

2.2 Lipase immobilization

The support polysiloxane–hydroethylcellulose (SiO₂–HEC) was prepared by a sol-gel technique and the resulting SiO₂–HEC was activated with epichlorohydrin and used to

immobilize the different lipases sources according to the methodology described by Vilas Bôas et al. [8]. The properties of the support were as follows: average pore diameter (32.10 Å); surface area BET (450.5 m² g⁻¹) and porous volume (0.36 cm³ g⁻¹) [26]. Diaion™ HP-20 resin bought from Sigma-Aldrich was also used as a support for the chosen lipase to mediate the esterification of fusel oil and lauric acid under continuous runs. This resin is based on a unique rigid polystyrene/divinylbenzene matrix and according to the manufacturer has the following properties: average pore diameter (290 Å); surface area BET (590 m² g⁻¹) and porous volume (1.3 cm³ g⁻¹).

For both matrixes, a similar procedure was used following the methodology described by Alves et al. [27]. For each gram of support (dry matter), 250 mg of lipase in its free form was used following by addition of 100 µL of an aqueous solution containing 5 mg mL⁻¹ of polyethylene glycol (1500 molecular weight). The suspensions containing enzyme and support were kept under stirring at 30 °C for 2 h, followed by static contact for an additional period of 18 h at 4°C. Recovery of the immobilized derivatives was carried out by vacuum filtration, with successive washes with hexane to remove excess moisture. Subsequently, the immobilized derivatives were conditioned in vacuum desiccators to reduce the moisture content below 6%. The enzymatic activities of the immobilized lipases were determined by the method of hydrolysis of olive oil, according to the methodology described by Vilas Bôas et al. [8]. The lipase G esterification activity was measured according to the methodology described by Pinto et al. [28].

2.3 Fusel oil treatment

The high content of water initially present in the fusel oil has been reduced through molecular sieves of 0.32 Å (sodium aluminum silicate) type 13 X-BHD Chemicals. It should be noted that the technique of fractional distillation for water removal present in the fusel oil

was not used due to the interest of keeping the original fusel oil composition to be used as a raw material in the esterification reactions. The concentration of water in the fusel oil was reduced from 15% to 0.1% as quantified by automatic Titler Karl Fisher (Koehler Model AKF5000).

2.4 Synthesis of isoamyl laurate under batch mode

The esterification reactions were carried in closed reactors (50 mL) containing 20 mL of a substrate composed of lauric acid and isoamyl alcohol at an equimolar ratio in the absence of solvents. The mixtures were incubated with 350 units of activity of each immobilized lipase, and the reactions were performed for a maximum period of 72 h, agitation (450 rpm) at 45 °C. Syntheses were monitored by analyzing samples taken from the reactor each 24 h and quantify the consumption of the isoamyl alcohol and product formed by gas chromatography. Batch reactions were also performed by replacement the isoamyl alcohol by fusel oil.

2.5 Synthesis of isoamyl laurate under continuous mode

The experiments were carried out in packed bed reactor (Diameter = 15 mm, Length = 55 mm and Volume = 10 mL) running on a continuous basis using feeding medium made up by fusel oil and lauric acid molar ratio of 1:1.5 in the presence of isooctane. The water content in the substrate was maintained at initial values less than 500 ppm by applying dehydration techniques using molecular sieves. The lipase was immobilized on different matrixes having different polarities: homemade hybrid silica hydroxyethyl cellulose (SiO₂-HEC) and HP Diaion resin-20 aiming at determining the behavior of water formed as a by-product in the catalytic bed. The immobilized derivatives showed similar hydrolytic activities of 3000 ± 120 U g⁻¹ and water content lower than 4%. The loading of the lipase immobilized was set at 80% of the catalytic bed and runs were carried out at 45 °C using in a suitable flow rate to give a

fixed space-time of about 3.2 h. The progress of the esterification was monitored by samples collected in the reactor output for determining the levels of both starting materials consumed and product formed (mainly isoamyl laurate). Water contents were also quantified by automatic Titrer Karl Fisher.

2.6 Determination of formed product and reagents consumed

Product formation (isoamyl laurate) and alcohol consumption (isoamyl) was determined by gas chromatography (Varian - Model GC 3800 Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a stainless steel packed column (80/100 mesh, 6ft, 2.0mm ID X 1/8 OD) and flame ionization detector (FID). The detector temperature was set at 230 °C and the injector at 190 °C. Nitrogen was used as the entrainment gas in a flow of 10 mL min⁻¹ and the entrainment gas flows to the detector were: 30 mL min⁻¹ of H₂ and 300 mL min⁻¹ of synthetic air. The set operating conditions were: column temperature set at 50 °C for 2 min and then programmed at 70 °C for 2 min at a rate of 20 °C min⁻¹ followed by heating to 120 °C at a rate of 20 °C min⁻¹ and maintained at 170 °C for 9 min. Octanol (50 g L⁻¹) in hexane was used as an internal standard. The collection and data analysis were performed using the data generated by the Galaxie System version 1.9. The lauric acid content was determined by measuring aliquots diluted in ethanol using 0.05 mol L⁻¹ KOH and phenolphthalein as indicator [8].

2.7 Isoamyl laurate purification

The output ester collected from the packed bed reactor was transferred to a 250 mL dropping funnel and neutralized with a Na₂CO₃ solution at 5% m/v (volume ratio 1:1), followed by addition of NaCl to separate the organic and aqueous phases. The organic phase was distilled to remove any residual fusel oil [29]. Then the purified sample was subject to the analyzes for quantification of the viscosity at 40 ± 0.1 °C using an LVDV-II cone and plate

spindle viscometer (Brookfield Viscometers Ltd, England); density with a DMA 35N EX digital densitometer (Anton Paar, Graz, Austria) at a temperature of 20 °C and water contents by Karl Fisher (Koehler Model AKF5000).

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Lipase screen for the synthesis of isoamyl laurate

All lipases were previously immobilized on epoxy SiO₂-HEC and, excepting for lipase from *Penicillium camembertii* (LG), the resulting immobilized derivatives displayed high catalytic activities in an aqueous medium in the range from 2184 to 3862 U g⁻¹ support as shown in Table 1. To avoid reaction reversibility, special care was taken to obtain immobilized preparations with low water level ($\leq 6\%$ w/w). It is important to mention that the catalytic activity of LG was measured in non-aqueous medium following the esterification of ethanol with oleic acid [28]. As the screening experiments were intended for an initial evaluation of the esterification activity of the lipases, they were conducted under a preliminary set of reaction conditions that may not have been the optimum set for all the lipases. In a typical reaction, 350 units of activity of the immobilized derivative were added to the mixture of isoamyl alcohol and acid lauric at the equimolar ratio. The screening results for the tested lipases are shown regarding consumption of the starting materials and ester formation as a function of time (Figure 2).

Figure 2

The observation of Figure 2 indicates that all tested lipases were able to form isoamyl laurate. However, the incorporation of lauric acid was dependent on the lipase source, which may be correlated with the specificity of each biocatalyst. Dependent on the lipase source the highest conversion took place from 24-72 h when the lowest acid concentrations were determined (Fig 2). For all runs, no reverse reaction was observed, and the reaction was

limited by the concentration of acid lauric, which was faster consumed than isoamyl alcohol. In fact, esterification reactions carried out with an excess of acid helps to increase the rate of the ester formation.

Among all the immobilized lipases on SiO₂-HEC, the lipase from *R. oryzae* gave the highest acid molar conversion ($\approx 82\%$ in 24 h). Slightly lower performances were achieved by lipases from *Candida rugosa* (LCR), *Pseudomonas fluorescens* (LAK) and *Burkholderia cepacia* (LBC) which attained similar molar conversion at 48 h. Lipase G provide the lowest performance, reaching maximum conversion (82%) in 72 h. In this way, this lipase preparation was considered ineffective for the proposed reaction.

In agreement with the results summarized in Table 2, among all the tested lipases, lipase *R. oryzae* showed the highest activity towards the formation of isoamyl laurate (88.33 mmol h⁻¹) and was chosen to perform the esterification reactions from acid lauric and fusel oil. Also, this lipase has consistently been shown to give high yields of ester products in many non-aqueous reaction conditions due to its high regioselectivity in the acylation of both primary and secondary alcohols [8].

Table 2

3.2 Enzymatic esterification of isoamyl laurate using fusel oil

Having selected the *Rhizopus oryzae* lipase as the most effective lipase in the synthesis of isoamyl laurate, subsequent tests were carried out by replacing the analytical isoamyl alcohol by fusel oil taking into consideration the conditions previously established for another similar model of study [8]. The reactions were conducted in closed reactors of 100 mL containing 20 mL of the substrate without adding solvents at alcohol to acid molar ratio of 1:1.5 (taking into consideration the contents of isoamyl alcohol present in the fusel oil). The mixture was incubated with *R. oryzae* lipase immobilized on SiO₂-HEC for a maximum

period of 72 h at 45 °C and the progress of the reaction is shown in Figure 3. The curve profiles indicate fast consumption of both reagents after 24 h attaining total acid molar conversion in 48 h of reaction.

Figure 3

The data obtained indicate generally that the excess of lauric acid ensured the formation of the complex enzyme-acyl group for further reaction with alcohol, thus leading to the formation of ester, and reducing in this way, the competition between the acceptors, parameter essential to the kinetics of the esterification reactions [16, 30]. This suggests that the synthesis of isoamyl laurate catalyzed by immobilized *R. oryzae* on SiO₂-HEC may be limited by the concentration of lauric acid, indicating the need to work with higher excess of this reagent to compensate the deviation of the lauric acid to form small levels of other esters such as ethyl, isopropyl and isobutyl laurates. As already stated fusel oil has a complex composition of alcohol as sources of nucleophilic that also consumes the lauric acid available in the reaction medium. Such results are also favorable compared with those reported in the literature [9] that reached 90% yield after 24 h using Lipozyme as a catalyst at 60 °C using heptane as a solvent.

3.3 Synthesis of isoamyl laurate under continuous runs

An attempt was made to run the packed bed reactor using the conditions previously determined for batch runs, however the reactor operation running on solvent-free medium was limited by the physical properties of the lauric acid (fusion point $\cong$ 43°C) which makes unfeasible to run the system due to the low solubility of lauric acid at the set up temperature (45 °C). As raising the temperature would impair the lipase thermal stability, a decision was made to feed the reactor with the diluted substrate using isooctane as a solvent. Thus the feed medium was prepared by keeping the same molar ratio 1: 1.5 (fusel oil: lauric acid) and

1 enough isooctane to decrease to about 0.40 mol L^{-1} the initial isoamyl alcohol concentration.
2 The immobilized *R. oryzae* lipase immobilized on SiO_2 -HEC having a hydrolytic activity of
3 $3500 \pm 120 \text{ U g}^{-1}$, and water level equal to 5% was loading the packed bed reactor at a
4
5 proportion to give about 80% of the catalytic bed. The experiments were carried out at 45°C
6
7
8
9 at a flow rate of 1.8 mL h^{-1} correspondent to a space-time of 3.24 h.
10

11 The results displayed in Figure 4 indicate that the state-steady was attained in 6 h and
12 this condition was maintained for at least 36 h (6 space-times). During this period, total
13 consumption of isoamyl alcohol and 90% of lauric acid was detected with consequent
14 formation of 0.40 mol L^{-1} of isoamyl laurate, corresponding to the volumetric productivity of
15 $277.8 \pm 19.3 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. As expected, such performance was higher than that attained
16 under batch mode. However, following this short period (48 h) a gradual decrease in the ester
17 formation was noted due to the water formed as a byproduct, which probably was partially
18 adsorbed on the immobilizing support. This is a well-known effect on lipase mediate
19 esterification reactions in which the amount of water affects both the reagents conversion as
20 well as the distribution of the product formed in the reaction medium, i.e., as the amount of
21 water increases, smaller conversions are found [31,32]. These results can be interpreted as the
22 high affinity of the hybrid matrix for the water formed as byproduct, modifying the substrate
23 interaction with the essential water around the enzyme limiting the substrate migration to the
24 solid phase and thereby reducing the enzyme activity. This was confirmed by determining the
25 biocatalyst half-life time ($t_{1/2}$) which revealed 173 h.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47

48 In the literature, several strategies have been already described to remove water
49 formed as a byproduct aiming to minimize the reverse hydrolysis reaction [21,22], but here
50 the decision was made to replace the silica-based matrix by a higher hydrophobic matrix
51 (resin Diaion HP-20) for immobilizing *Rhizopus oryzae* lipase. This resin was made from
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

copolymer polystyrene/divinylbenzene and is considered to be excellent support for physical adsorbing lipase [27, 28, 33, 34]. Interestingly, adsorption on the support often leads to enhancement of the catalytic activity of the lipase. This is interpreted as being due to hydrophobic interactions between the support and part of the lipase molecule-causing opening of the lid to yield the active conformation, in analogy with the interfacial activation caused by a hydrophobic substrate phase [18, 27]. By using this support, it was possible to obtain an immobilized derivative having high hydrolytic activity $2504 \pm 36 \text{ U g}^{-1}$ and low water level (3%), which was used to run the packed bed reactor under the same previous conditions (flow rate = 1.8 mL L^{-1} and space-time = 3.12 h).

The results exhibited in Figure 5 indicate that the immobilized lipase on polymeric resin provide better performance than the hybrid matrix, allowing the steady-state to be reached in 9 hours (3 space times) and attain an average of 0.42 mol L^{-1} of isoamyl laurate, reflecting high consumption of both lauric acid and isoamyl alcohol. It was also observed that there were no significant differences in the formation of isoamyl laurate during the whole process (144 h) running on a continuous basis, revealing average productivity of $794.43 \pm 66.04 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ and high biocatalyst half-life ($t_{1/2} = 285 \text{ h}$).

Figure 5

Table 3 compares the performance of esterification reactions carried out with the lipase immobilized on each tested support. For both experiments, the state-steady was attained with less than 3 space-times (9 h), and the best reactor performance was found in the system operated with the lipase immobilized on resin Diaion HP-20. This can be credited to the low affinity of the support by the water generated as a by-product, suggesting that this immobilization has reduced the hydrophilic character of the immobilized derivative, according to the polar groups present in the resin. In this way, both the product and water

generated were continuously removed from the enzymatic environment and, therefore, the steady-state inside the reactor was controlled without the need for additional water removal techniques. This behavior can be better visualized in Figure 6 that shows the water concentration profile in the reactor output by both runs. It is clear that the water concentration on the system packing with the immobilized lipase on a hybrid support is decreasing as a function of time confirming that the water generated as byproduct was partially adsorb on the support, contrary to that observed on the reactor packed with immobilized lipase on polymer resin. In this case, the concentration of the water was gradually increased from the initial 0.02% to 0.12% without decreasing the biocatalyst activity or interfering on the right reaction direction (synthesis).

Table 3
Figure 6

Complementary experiments were carried out to better understand the role of water on the catalytic bed by running the esterification reactions on higher substrate concentration (0.8 mol L⁻¹ of isoamyl alcohol). This is an important point since substrate concentration may affect the activity of the enzyme and also on the distribution of water within the medium. Despite such increase on the substrate concentration similar behavior was observed as previously found and a stable reactor operation was maintained constant over the whole continuous run, attaining average ester concentration 0.80 ± 0.08 g L⁻¹, corresponding to a volumetric productivity of 1598.68 ± 135.79 μmol g⁻¹ min⁻¹ and biocatalyst half-life ($t_{1/2}$) in about 248 h (Figure 7).

Figure 7

The product obtained was purified and the determined properties concerning kinematic viscosity at 40° C (5.64 mm² s⁻¹), density (807.6 kg m⁻³) and water content (0.036%) were

similar to those normally found in trade products recommended for ingredients used in personal care formulations. In particular, it can be mentioned the ECOSILK a trade product commercialized by Aromantic Ltd (Belgium) which is a colorless, liquid emollient commonly used in color cosmetics and skin care products as a solvent, carrying agent, pigment wetting agent, or fragrance fixative. It contains 90% of isoamyl laurate and 10% of isoamyl cocoate with the following properties: Acid value (mgKOH g⁻¹): Density @ 20°C (kg m⁻³): 850 – 890 and viscosity @ 40°C (mm² s⁻¹): 3.9 [35].

These results demonstrated the continuous bioreactor model developed in this study was more effective than other systems previously reported (Table 4) and highlighted the importance of taking into account a rigid control of water in the whole process, including the support polarity used as a matrix for immobilizing the selected lipase.

Table 4

Although Woodcock et al. [25] reported that esterification reaction of butyl alcohol with lauric acid using Novozym 435 as the catalyst gave a yield of more than 99% of butyl laurate under continuous flow; there was a significant decrease to 67% yield after 2 h (i.e., a reduction of 23.1%). On the other hand, Chang et al. [36] reported that under optimized conditions (n-hexane solvent system, 45 °C temperature, 1:2 substrate molar ratio and 4.5 mL min⁻¹ reaction flow rate; space-time = 75 min), it was possible to obtain high molar conversion 97% (435.6 μmol min⁻¹). In the synthesis of hexyl laurate catalyzed by Lipozyme IM-77 as catalyst in a solvent-free system under continuous packed bed reactor Ju et al. [37] reported that the ester productivity of 81.58 ± 1.76 μmol min⁻¹ can be attained at 55 °C, a flow rate of 0.5 mL min⁻¹ and lauric acid concentration of 0.3 mol L⁻¹. Under these conditions, the maximum molar conversion was 60%.

4. CONCLUSIONS

This work demonstrated the ability of applying the fusel oil as a source of low-cost isoamyl alcohol for yielding isoamyl laurate label as a green product with excellent pigment dispersibility that can be used in the formulation of various cosmetics. By selecting the potential lipase source and controlling the process parameters including the right choice of the reaction medium, high productivity of isoamyl laurate was obtained. The selected lipase was *R. oryzae*, which has high regioselectivity in the acylation of primary and secondary alcohols, though its performance depends on the immobilizing matrix, which had significantly influenced on the conversion of the ester over time, particularly in the reactions carried out on continuous flow. Between the two tested matrixes, the best performance was achieved in the system operated with lipase immobilized in a polymer resin, which allow attaining average productivity of $1598.68 \pm 135.79 \mu\text{mol g}^{-1} \text{min}^{-1}$ and biocatalyst half-life ($t_{1/2}$) in about 248 h.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant number #2016/10636-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Process Number 404812/2013-9) and CAPES (Renata N. Vilas Bôas doctoral fellowship).

REFERENCES

- [1] A. G. Patil, S. M. Koolwal, S. M., Butala, H. D., Fusel oil: composition, removal and potential utilization, *Int. Sugar J.* 104 (2002) 51-58.
- [2] M. C. Ferreira, A. J. A. Meirelles, E. A. C. Batista, Study of the fusel oil distillation process, *Ind. Eng. Chem. Res.* 52 (2013) 2336-2351.
- [3] A. Calam, H. Solmaz, A. Uyumaz, S. Polat, E. Yilmaz, Y. İçingur, Investigation of usability of the fusel oil in a single cylinder spark ignition engine, *J. Energy. Inst.* 88 (2015) 258-265.

- [4] F. D. Mayer, L. A. Feris, N. R. Marcilio, P. B. Staudt, R. Hoffmann, V. Baldo, Influence of fusel oil components on the distillation of hydrous ethanol fuel (HEF) in a bench column, *Braz. J. Chem. Eng.* 32 (2) (2015) 585-593.
- [5] D. L. Xiong, J. H. LI, H. M. Zhong, Purification & separation of fusel oil and its application, *Liq. Mak. Science Tech.* 4 (166) (2008) 65-74.
- [6] R. Kirdi, N. B. Akacha, Y. Messaoudi, M. Gargouri, Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 22(4) (2017) 413-422.
- [7] A. Anschau, V. C. Aragão, B. D. A. Porciuncula, S. J. Kalil, C. A. V. Burkert, J. F. M. Burkert, Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate, *J. Braz. Chem. Soc.* 22 (11) (2011) 2148-2156.
- [8] R. N. Vilas Bôas, F. C. Biaggio, D. S. Giordani, H. F. De Castro, Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fusel oil as feedstock, *Quim. Nova.* 40 (5) (2017) 541-547.
- [9] H. F. De Castro, R. Y. Moriya, P. C. Oliveira, C. M. F. Soares, Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 77-79 (1999) 817-826.
- [10] N. Dormo, K. Belafi-Bako, L. Bartha, U. Ehrenstein, L. Gubicza, Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system, *Biochem. Eng. J.* 21 (2004) 229-234.
- [11] N. R. Khan, V. K. Rathod, Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review, *Process Biochem.* 50 (2015) 1793-1806.
- [12] M. N. Varma, G. Madras, Synthesis of isoamyl laurate and isoamyl stearate in supercritical carbon dioxide, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 141 (1) (2007) 139-147.
- [13] Z. Küçük, K. Ceylan, Potential utilization of fusel oil: A kinetic approach for production of fusel oil esters through chemical reaction, *Turk. J. Chem.* 22 (1998) 289-300.
- [14] P. Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. M. Afendra, A. Pandey, E. Papamichael, Advances in lipase-catalyzed esterification reactions, *Biotechnol. Adv.* 31 (2013) 1846-1859.
- [15] A. Rajendran, A. Palanisamy, V. Thangavelu, Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52 (1) (2009) 207-219.
- [16] J. Choi, S. Han, H. Kim, Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 1443-1454.
- [17] S. H. Krishna, N. G. Karanth, Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. In: DEKKER, M. *Catalysis reviews*. New York: Madson Avenue, 2002. p.499-591.

- [18] P. Adlercreutz, Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6406-6436.
- [19] M. B. Ansorge-Schumacher, O. Thum, Immobilised lipases in the cosmetics industry, *Chem. Soc. Rev.* 42 (15) (2013) 6475-6490.
- [20] S. Clendennen, J. Yuan, An enzymatic approach to sustainable manufacturing of personal care ingredients: reducing the traditional environmental impact of a consumer product's life cycle, *Euro Cosmetics*. 9 (2015) 30-34.
- [21] L. Tamborini, P. Fernandes, F. Paradisi, F. Molinari, Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification, *Trends Biotechnol.* 36 (1) (2018) doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.09.005.
- [22] L. Freitas, G. S. Silva, J. C. Santos, P. C. Oliveira, H. F. De Castro, Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor, *Eur. Food Res. Technol.* 233 (2011) 743-750.
- [23] V. M. Balcao, A. L. Paiva, F. X. Malcata, Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme Microb. Technol.* 18 (1996) 392-416.
- [24] Y. Chisti, Bioreactor design. In: Ratledge C, Kristiansen B (eds) *Basic biotechnology*, 3rd edn. Cambridge University Press, Cambridge, 2006. p 181-200.
- [25] L. L. Woodcock, C. Wiles, G. M. Greenway, P. Watts, A. Wells, S. Eyley, Enzymatic synthesis of a series of alkyl esters using Novozym 435 in a packed-bed, miniaturized, continuous flow reactor, *Biocatal. Biotransform.* 26 (6) (2008) 501-507.
- [26] L. S. Martin, A. Ceron, P. C. Oliveira, G. M. Zanin, H. F. De Castro, Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions, *J. Ind. Eng. Chem.* (2018) doi.org/10.1016/j.jiec.2018.01.029.
- [27] Alves, M. D., Aracri, F. M., Cren, É. C., Mendes, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem. Eng. J.*, 311 (2017) 1-12.
- [28] M. C. C. Pinto, D. M. G. Freire, J. C. Pinto, Influence of the morphology of core-shell supports on the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*, *Molecules*. 19 (2014) 12509-12530.
- [29] L. C. D. Lima, D. G. C. Peres, A. A. Mendes, Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* (2018) doi.org/10.1007/s00449-018-1929-9.
- [30] K. Faber, *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*, 6rd Edition, Springer Produktions-Gesellschaft, Berlin, 2011. 436p.

- [31] M. L. Foresti, M. L. Ferreira, Frequent analytical/experimental problems in lipase-mediated synthesis in solvent-free systems and how to avoid them, *Anal. Bioanal. Chem.* 381 (7) (2007) 1408-1425.
- [32] A. R. M. Yahya, W. A. Anderson, M. Moo-Young, Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions, *Enzyme Microb. Technol.* 23 (7-8) (1998) 438-450.
- [33] K. Palanisamy, K. Kuppanmuthu, A. Jeyaseelan, *Bacillus* sp. PS35 lipase-immobilization on styrene-divinylbenzene resin and application in fatty acid methyl ester synthesis, *Iran. J. Biotechnol.*, 13(3) (2015) 39.
- [34] K. Hernandez, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads, *Enzyme Microb. Technol.*, 49 (1) (2011) 72-78.
- [35] Ecosilk, Product Specification Isoamyl Laurate. <<https://www.aromantic.co.uk/technical-documents/specifications/ecosilk-specification-sheet-aro.aspx>> Access in 2018.
- [36] S. Chang, J. Shaw, Y. Cheng-Kang, C. Shieh, Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor, *Process Biochem.* 42 (2007) 1362-1366.
- [37] H. Ju, C. Yang, Y. Yen, Y. Shieh, Continuous lipase-catalyzed synthesis of hexyl laurate in a packed-bed reactor: optimization of the reaction conditions in a solvent-free system, *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 84 (1) (2008) 29-33.

Table 1. Enzymatic activity (U g⁻¹) and water level of the immobilized lipases on SiO₂-HEC

Lipase source	Code	Catalytic activity (U g ⁻¹)	Water level (%)
<i>Candida rugosa</i> ¹	LCR	2941±40	2.48±0.54
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ¹	LAK	2184 ±44	3.23±1.79
<i>Burkholderia cepacia</i> ¹	LBC	2344 ± 53	2.82±1.46
<i>Rhizopus oryzae</i> ¹	LRO	3862 ±61	5.73±0.52
<i>Penicillium camembertii</i> ²	LG	106 ± 15	5.81±0.70

¹Hydrolysis of olive oil (emulsion 50%; pH 7.0; temperature 37 °C).

²Esterification activity (ethanol and oleic acid, temperature 40 °C).

Table 2. Esterification of isoamyl alcohol with lauric acid catalyzed by different sources of lipases

Lipase source	Molar conversion (%)	Reaction time (h)	Isoamyl laurate (molL ⁻¹)	Productivity (mmol h ⁻¹)
<i>Candida rugosa</i>	83.04±6.34	48	2.24±0.9	46.67±1.87
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	82.79±8.31	48	2.42±0.11	50.42±2.30
<i>Burkholderia cepacia</i>	89.90±6.71	48	2.21±0.14	46.04±2.95
<i>Rhizopus oryzae</i>	81.86±3.54	24	2.12±0.28	88.33±1.20
<i>Penicillium camemberti</i>	82.22± 4.41	72	2.13±0.04	29.58± 5.80

Table 3 –Comparison of the performance of the *R. oryzae* lipase immobilized on different supports in the esterification of fusel oil with lauric acid carried out in packed bed reactor in continuous flow, fusel oil to lauric acid molar ratio (1:1.5) in the presence of iso-octane at 45 °C

Parameter	Lipase-SiO ₂ -HEC	Lipase-Diaion HP-20
Biocatalyst activity (U g ⁻¹)	3862 ± 86	2846 ± 69
Flow rate (mLh ⁻¹)	1.8	1.8
Space-time (h)	3.24	3.12
Isopentanol concentration (mol L ⁻¹)	0.40	0.42
Lauric acid (mol L ⁻¹)	0.56	0.61
Water concentration % (initial)	0.02	0.03
Water concentration % (final)	0.04	0.18
Molar conversion (%)	100	100
Product concentration (mol L ⁻¹)	0.43 ± 0.03	0.40 ± 0.03
Productivity (μmol. g ⁻¹ . min ⁻¹)	277.8 ± 19.3	794.43 ± 66.04
Biocatalyst half-life time (h)	173	285

Table 4 – Production of laurate esters in continuous process using different alcohols in comparison with results obtained in the present study

Lipase	Starting materials	Solvent	Molar ratio alcohol: acid	Flow rate (mL.h ⁻¹)	Space-time (h)	Molar conversion (%)	Product concentration (mol L ⁻¹)	Productivity (μmol.min ⁻¹)	Reference
Novozym 435®	lauric acid /butanol	hexane	0.2: 0.2	0.06	2	67	not reported	Not reported	Woodcock et al. [25]
Lipozyme IM™	lauric acid /isopentanol	hexane	1:2	270	0.43	97	not reported	435.6 ± 0.9	Chang et al. [36]
Lipozyme IM™	lauric acid /hexanol	absent	0.3	3.0	not reported	60	not reported	81.58 ± 1.76	Ju et al. [37]
<i>R. oryzae</i> immobilized on Diaion resin	lauric acid /fusel oil	iso-octane	0.80: 1.2	1.8	3.12	100	0.80 ±0.07	4273 ± 373	This work

Figure captions

Figure 1. Experimental scheme of the packed bed reactor: 1 glass column; 2 feeding reservoir; 3 peristaltic pumps; 4 product output; 5 bath for temperature control; 6 water in; 7 water out.

Figure 2 - Profile of the consumption of isoamyl alcohol (●) and lauric acid (■) in the ester formation (○) during the progress of the esterification reaction of isoamyl alcohol with lauric acid catalyzed by lipases: (a) *Candida rugosa*, (b) *Pseudomonas fluorescences*, (c) *Burkholderia cepacia*, (d) *Rhizopus oryzae*, (e) *Penicillium camemberti* immobilized on SiO₂-HEC.

Figura 3. Profile of the consumption of isoamyl alcohol (●) and lauric acid (■) in the formation of isoamyl laurate (○) in the esterification reaction of the fusel oil with lauric acid under batch run (alcohol to acid molar ratio of 1:1.5 and temperature of 45 °C).

Figure 4. Consumption profile of isoamyl alcohol (●) and lauric acid (■) in the formation of the isoamyl laurate (○) in the esterification of fusel oil with lauric acid using immobilized lipase on SiO₂-HEC running on continuous flow

Figure 5 Consumption profile of isoamyl alcohol (●) and lauric acid (■) in the formation of the isoamyl laurate (○) using immobilized lipase on HP 20 Diaion resin running on continuous flow

Figure 6 – Monitoring the water content (%) in the liquid phase as a function of time in the synthesis of isoamyl laurate performed in packed bed reactor loading with *R.oryzae* immobilized on different supports (▽) SiO₂-HEC and (▲) HP 20 Diaion resin.

Figure 7- Formation of isoamyl laurate in packed bed reactor loading with *R.oryzae* immobilized on HP 20 Diaion running with substrate having higher concentration of isoamyl alcohol (0.8 mol L⁻¹).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

ANEXO III

Manuscrito previamente submetido referente ao Capítulo 6: VILAS BÔAS, R. N. et al. Biolubricant synthesis by enzymatic esterification of fusel oil with oleic acid in a two-stage packed bed reactor incorporating a water extraction column. Industrial & Engineering Chemistry Research, MS ie-2018-03823e.

**Biolubricant synthesis by enzymatic esterification of fusel oil with oleic acid
in a two-stage packed bed reactor incorporating a water extraction column**

Renata N. Vilas Bôas¹, Pedro C. Oliveira¹, Francisco C. Biaggio¹, Adriano A. Mendes²,
Heizir F. de Castro^{1*}

¹Engineering School of Lorena, University of São Paulo, 12.602-810- Lorena – SP, Brazil

²Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-001, Alfenas, MG, Brazil

*Corresponding author
Email: heizir@dequi.eel.usp.br

ABSTRACT

The esterification of fusel oil, a byproduct obtained from bioethanol distilleries, with oleic acid catalyzed by lipase from *Rhizopus oryzae* (ROL) immobilized on polystyrene/divinylbenzene copolymer resin (STY-DVB) was assessed in a two-stage packed bed reactor running on a continuous flow. Molecular sieves were used to remove the water formed as byproduct by coupling the reactor with a column extractor. The modification presented herein introduces a pathway for replacing saturated molecular sieves by regenerated sieves at a given time. Ester synthesis on a continuous run carried out without a water column extractor was used as a control. The performance of the proposed system was quantitatively confirmed for space-times of 10.2 h, thus resulting in average productivities of $292.20 \pm 18.46 \mu\text{mol}_{\text{ester}} \text{g}^{-1} \text{min}^{-1}$, with minimal feedstock lost and good stability of the immobilized lipase, revealing an average half-life time of 179.6 h. The properties of the output samples were similar to the commercialized DB 32 type dicarboxylic acid ester. In addition, the ester purity was confirmed by attenuated total reflection coupled with Fourier transform infrared (ATR-FTIR), proton (^1H NMR) and carbon (^{13}C NMR) nuclear magnetic resonance spectroscopy analyses. This product may prove useful in the search for bio-based industrial materials, such as biolubricant, surfactant, and fuel additive.

Keywords: biolubricant synthesis, immobilized lipase, fusel oil, esterification, continuous runs.

INTRODUCTION

Fusel oil is a byproduct from the sugarcane-to-ethanol process, being composed primarily by isoamyl alcohol (> 60 wt %). Despite its exploitation does not act directly on reducing the final cost of the alcohol, its application as feedstock in manufacturing industries, surely, represents an important step to increase the overall efficiency of the ethanol industries.¹⁻³ Studies suggest several alternatives to use fusel oil, from which its application as feedstocks in esterification reactions seems to be the best choice on account of the variety of esters that can be obtained depending on the acyl donor, such as acetic acid;⁴ butyric acid;⁵ caprylic acid;⁶ lauric acid⁷ and oleic acid⁸.

Among these, focus has been given on the production of biolubricant by esterification reaction with oleic acid using either chemical (sulfuric acid)^{9,10} or biochemical (lipase)^{3,8} catalysts. There are several benefits of using enzymes, like lipases, over chemical catalysts, such as the use of moderate temperature and atmospheric conditions, high stereo-, regio- and enantio-selectivity that drastically reduce the formation of undesirable byproducts and, thus, waste generation.^{3,8,6,11,12}

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are versatile enzymes able to catalyze hydrolysis as well as esterification reactions.^{13,14} Enzyme-catalyzed esterification reactions have acquired increasing attention in many applications, due to the significance of the derived products.¹¹ More specifically, the lipase-catalyzed esterification reactions attracted research interest over the past decades due to an increased use of organic esters in biotechnology and the chemical industry^{14,15}

The direct esterification of carboxylic acids with alcohols is the most popular method for the synthesis of esters with aromatic¹⁶, emulsifying¹⁷ and biolubricant¹⁸ properties. However, the literature concerning the use of lipase for the synthesis of biolubricant by direct

esterification of fusel oil with long-chain carboxylic acids, is scarce.^{3,8} Such observation may be associated with the technical difficulties involved when natural mixtures of alcohols are used in esterification reactions, as for example, the competition between two or more nucleophiles by the same active site of the enzyme¹⁹ and the high water content present in this material.^{6,7} In this specific case, it is recommended that the reaction should be performed with excess of the acyl donor to allow full use of other alcohols present at lesser proportion in fusel oil, like ethanol, butanol, pentanol, among others. Vilas Bôas et al.⁶ estimated by factorial design that a molar ratio between caprylic acid and fusel oil should be greater than 1.5 to achieve high yields in esters and low residual concentration of both starting materials.

With respect to the high water content present in fusel oil, dehydrating techniques by molecular sieves, are also reported in literature, as the most effective procedure to reduce the water levels into the required range to perform lipase-catalyzed esterification reactions.⁶ However, there are other sources of water that need to be taken into account, as for example, the water generated as byproduct. The fate of the produced water if not eliminated from the reaction medium is to gradually decrease the formation of ester by the effect of the reverse hydrolysis reaction.²⁰⁻²² From the strategies normally described to minimize the hydrolysis reaction, the use of desiccant agents, like molecular sieves, has consistently demonstrated excellent results.^{21,22} The use of molecular sieves had two advantages; firstly, it shifted the equilibrium towards ester synthesis. Secondly, it stabilized the product by preventing its hydrolysis by absorbing excess water in the system in comparison to the system without the molecular sieves.²⁰

The aim of this study was to synthesize biolubricant esters by direct esterification of dehydrated fusel oil with oleic acid on a continuous flow using packed bed reactor (PBR). In order to better understanding the role of water generated during the ester synthesis, PBR in series with a water column extractor packed with molecular sieves was used and its

performance compared with a control system (absence of water removal). This strategy has not been used for the enzymatic ester synthesis using fusel oil as an acyl acceptor yet. As aforementioned, the enzymatic esterification of fusel oil with oleic acid has been performed using a commercial biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase B from *Candida antarctica* (CALB) on macroporous resin Lewatit VP OC 1600 – Novozym 435.^{3,8} although their results were limited to batch and recycle runs. In addition, study carried out by Séverac et al.²³ demonstrated that this biocatalyst has high capacity to adsorb hydrophilic molecules on its microenvironment.

In order to overcome such limitation, a mesoporous and hydrophobic polystyrene/divinylbenzene copolymer resin (STY-DVB) was used as support to prepare a heterogeneous biocatalyst aiming at reducing possible accumulation of the water on the biocatalyst surface. The immobilization of lipases on hydrophobic supports, like STY-DVB resin, have been preferentially carried out via mechanism of interfacial activation – physical adsorption of the enzyme in open conformation on both internal and external support surfaces.^{12,13,24} This strategy allows preparing heterogeneous biocatalysts with high catalytic activity and reusability due to its high capacity to immobilize enzymes and stabilization of the 3D structure of several lipases.^{12,24-26}

Lipase from *Rhizopus oryzae* (ROL) was selected as the enzyme model due to its high catalytic activity in the synthesis of valuable esters by esterification, transesterification and interesterification reactions.^{6,27-29} Its use as potential biocatalyst for the synthesis of biolubricant, is still scarce reported.^{29,30}

The enzymatic esterification of oleic acid and fusel oil was carried out in isooctane, a hydrophobic solvent with Log P value of 4.37, to reduce the viscosity of reactants solution and, thus, improve their accessibility to the active sites of immobilized ROL. Furthermore, isooctane has been successfully used as non-polar solvent in enzymatic synthesis of esters

using several lipases because the essential layer hydration remains bound to lipase structures, thus preserving their catalytic activity and stability.^{31,32}

EXPERIMENTAL SECTION

Materials

Microbial lipase from *Rhizopus oryzae* was acquired from Biocatalysts Ltd. (Cardiff, Wales, UK) and used as received without further purification. Diaion™ HP-20 resin was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). This resin is based on a unique rigid polystyrene/divinylbenzene support and according to the manufacturer has the following properties: average pore diameter (260 Å); surface area (500 m² g⁻¹) and porous volume (1.01 cm³ g⁻¹). Fusel oil was gently supplied by the distillery São Martinho S.A. (Iracema Unit, Iracemápolis, SP, Brazil) with the approximation of 65% isoamyl alcohol, 8% isobutyl alcohol, 0.4% n-butyl alcohol, 1.5% n-propyl alcohol, 10% ethyl alcohol and 15% water. Molecular sieves (3 Å) (sodium aluminum silicate) were bought from Sigma-Aldrich. Other reagents used were: oleic acid (Cromoline, 98%), heptane and hexanol (Vetec), isooctane (Cromoline), polyethylene glycol- PEG-1500 (Sinthy), gum arabic (Synth), potassium hydroxide (min 85%, Cromoline) and olive oil with low acidity (Carbonell, purchased in a local market). The standard isoamyl oleate for calibration method via chromatographic analysis was obtained by chemical synthesis according to Vilas Bôas et al.⁶

Lipase immobilization

A procedure described by Alves et al.²⁴ was used with slight modifications. 10 g of STY-DVB particles were initially wetted with 50 mL ethanol solution (95%) under static conditions for 18 h at room temperature. After, the support was filtered in a Buchner funnel under vacuum and thoroughly washed with distilled water in order to remove residual ethanol solution. The wet support (10 g) was then incubated in 190 mL of 5 mM sodium phosphate

pH 7.0 containing 250 g enzyme per g of support. The suspensions were kept under agitation (200 rpm) in an orbital shaker at room temperature for 12 h. The biocatalysts prepared were then filtered (Whatman filter paper 41) under vacuum, washed with distilled water (volume ratio 1:5) following by successive washes with chilled hexane to remove excess moisture. Subsequently, the immobilized biocatalysts were conditioned in vacuum desiccator to reduce the moisture content below 5%. The resulting immobilized biocatalyst has an average hydrolytic activity of $3,040 \pm 185 \text{ U g}^{-1}$, following the hydrolysis of olive oil emulsion, as described by Vilas Bôas et al.⁶

Fusel oil treatment

The high content of water initially present in the fusel oil has been reduced by molecular sieves according to the methodology previously established by Vilas Bôas et al.⁶ It should be noted that the technique of fractional distillation for water removal was not used due to the interest of keeping the original fusel oil composition to be used as a raw material in the esterification reactions. The concentration of water in the fusel oil was reduced from 15% to 0.1% as quantified by automatic Titler Karl Fisher (Koehler Model AKF5000).

Enzymatic esterification of fusel oil and oleic acid under batch mode

Reactions were performed in a jacket cylindrical glass reactor (5.5 cm height x 4 cm internal diameter and 70 mL capacity, coupled with a reflux condenser) containing 20 g of substrate consisting of fusel oil and oleic acid at molar ratio of 1:1.5 in the presence of isooctane. Mixtures were incubated with immobilized lipase at fixed proportion of 350 U of activity per gram of substrate. Duplicate reactions were performed for a maximum period of 24 h, under constant stirring (150 rpm) at 45 °C. Syntheses were monitored by analyzing samples taken from the reactor at different times and quantify the consumption of the isoamyl alcohol and product formation by gas chromatography.

Enzymatic esterification of fusel oil and oleic acid under continuous flow

The esterification runs were carried out in jacketed glass columns, and the temperature in the reactor was kept at 45 °C, by circulating water in the jacket. The strategy selected to remove the water formed in the esterification runs makes use of molecular sieves. For this purpose, two experimental setups were performed: (i) control reaction, the reactor was packed with 2.60 g immobilized lipase and no strategy was performed to remove the formed water and (ii) two-stage packed reactor coupling with a water column extractor, with the possibility of replacing the saturated molecular sieves by regenerated sieves at a given time: each column was packed with 2.60 g immobilized lipase and the column between them contained 7.30 g molecular sieves, that corresponded to a mass ratio of 1:3 immobilized lipase: molecular sieves (Figure 1). Saturated molecular sieves were replaced by regenerated ones at least every two space-times. The dimensions of each column reactor were diameter = 15 mm, length = 55 mm and volume = 10 cm³.

Figure 1

The reaction mixture of fusel oil and oleic acid at molar ratio of 1:1.5 in the presence of isooctane was kept in a feed flask under magnetic stirring (150 rpm) at 45 °C. The water content in the substrate was maintained at initial values less than 500 ppm by using molecular sieves. The substrate was pumped through the columns with the assistance of a peristaltic pump (SJ-1211, Atto) at proper flow rate. The space-time was calculated according to Levenspiel³³ taking into consideration the density of the immobilized biocatalyst as 0.6935 g cm⁻³. The progress of the esterification was monitored by samples collected in the reactor output for determining the levels of both starting materials consumed and product formed (mainly isoamyl oleate). Water contents were also quantified by automatic Titrer Karl Fisher (Koehler Model AKF5000). Ester productivity was calculated as the ratio between the number of moles of produced ester per reaction time and mass of the immobilized biocatalyst.

Determination of reactants and product concentrations

Product formation (isoamyl oleate) and alcohol consumption (isoamyl alcohol) were determined by gas chromatography (Varian - Model GC 3800 Varian, Inc., Palo Alto, CA, USA) equipped with a capillary column having the following features: 30 m length, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 μm film thickness and flame ionization detector (FID). The detector temperature was set at 230 $^{\circ}\text{C}$ and the injector at 190 $^{\circ}\text{C}$. Nitrogen was used as a carrier gas at flow of 1 mL min^{-1} , and the gas flow rates to the detector were: 30 mL min^{-1} of H_2 and 300 mL min^{-1} of synthetic air. The set operating conditions were: column temperature set at 40 $^{\circ}\text{C}$ for 1 min and then programmed at 70 $^{\circ}\text{C}$ for 3 min at a rate of 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ followed by heating to 120 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 20 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ and maintained at 250 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ for 5 min. Octanol (10 g L^{-1}) in hexane was used as an internal standard. The collection and data analysis were performed using the data generated by the Galaxie System version 1.9. The oleic acid content was determined by measuring aliquots diluted in ethanol using 0.05 mol L^{-1} KOH and phenolphthalein as indicator.⁶

Ester purification

The output ester collected from the packed bed reactor was transferred to a 250 mL dropping funnel and neutralized with a Na_2CO_3 solution at 5 wt. % (volume ratio 1:1), followed by addition of NaCl to separate the organic and aqueous phases. The organic phase was distilled to remove any residual fusel oil. Then, the purified sample was subject to the analyzes for quantification of the viscosity at 40 ± 0.1 $^{\circ}\text{C}$ using an LVDV-II cone and plate spindle viscometer (Brookfield Viscometers Ltd, England); density with a DMA 35N EX digital densitometer (Anton Paar, Graz, Austria) at a temperature of 20 $^{\circ}\text{C}$ and water contents by automatic Titrer Karl Fisher (Koehler Model AKF5000). The absolute viscosity was determined with an LVDV-II cone and plate spindle viscometer (Brookfield Viscometers Ltd,

England) using a CP 42 cones at 40 ± 0.1 °C. Samples of 0.5 mL were used, and the measurements were repeated three times. The viscosity index was determined in a Stabinger Viscometer (SVM TM 3001 Anton Paar GmbH) following the ASTM D7042 standard and by means of the software provides the viscosity index using the ASTM D 2270 method. ATR-FTIR spectra for fusel oil, isoamyl alcohol, oleic acid and isoamyl oleate were recorded on a Spectrum GX Fourier-transform infrared spectrometer (Perkin Elmer, USA). FT-IR spectroscopy readings of the samples was obtained from the accumulation of a total of 32 scans at a range of 4000 to 400 cm^{-1} with resolution of 4 cm^{-1} and potassium bromide (KBr) was used as a matrix. ¹H (300 MHz) and ¹³C (75 MHz) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Mercury 300 MHz Varian apparatus spectrometer. The purified ester was dissolved in CDCl_3 , and the resulting solution was placed in a 5 mm diameter NMR tube.

RESULTS AND DISCUSSION

Biolubricant synthesis in a batch run

In this study, immobilized ROL on STY-DVB was used as heterogeneous biocatalyst in the esterification reaction of fusel oil with oleic acid in an isooctane medium. The experimental conditions were optimized in a previous study carried out in our lab for the esterification of fusel oil with caprylic acid catalyzed by immobilized ROL via physical adsorption on a homemade hybrid support (SiO_2 - β cyclodextrin).⁶ Here, the ester synthesis was conducted under the same experimental conditions: 350 U of activity per gram of substrate, 45 °C, 150 rpm and fusel oil to acid molar ratio of 1:1.5.

Time course study gives an insight into the performance of immobilized ROL on STY-DVB as the reaction progress. Such reaction profile helps to determine the time necessary for obtaining the highest ester yield and so enhance cost-effectiveness of the process. The progress of the reaction was determined by reactants consumption – oleic acid and isoamyl

alcohol, the majority short-chain alcohol present in fusel oil composition (around of 65% wt.), and product formation, in this case isoamyl oleate.

As shown in Figure 2, the ester formation was gradually increased with the progress of the reaction time up to 24 h when the reaction attained the equilibrium providing a total conversion of isoamyl alcohol into isoamyl oleate ($0.74 \pm 0.07 \text{ mol L}^{-1}$). This corresponds to a productivity of $10.28 \text{ } \mu\text{mol ester g}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Data obtained here, indicate, in general, that the excess of oleic acid ensured the formation of complex acyl-enzyme for further reaction with alcohol, leading to formation of ester, and thereby reducing the competition between the acceptors of the acyl group, essential parameter for the kinetics of esterification reactions.^{6,22,25} It was also verified that no reversibility occurred in the esterification runs.

Figure 2

Such results are in agreement with data reported in literature, in particular with the results reported by Oliveira et al.²⁶ concerning the enzymatic esterification of butanol with butyric acid in the presence of heptane using *Candida rugosa* lipase immobilized on styrene-divinylbenzene copolymer (STY-DVB) as biocatalyst. In this case, analysis of reactants polarity measured as partition coefficient showed higher value for butanol than for butyric acid, favoring butanol migration to the solid phase (immobilized lipase). Thus, there should be more alcohol than acid at the active site of the immobilized lipase, requiring an excess of acid in the reaction medium to provide equimolar amounts of reactants and satisfactory yields. No inhibition of enzyme activity was detected when butyric acid was used in excess. Actually, the esterification progress was limited by the availability of butyric acid in the reactor vessel, and the highest percentage was attained when the acid: alcohol molar ratio was 1.5 to 1. Similar results are also reported for other lipases, for example, studying the esterification of fusel oil with caprylic acid catalyzed by immobilized ROL on SiO_2 - β cyclodextrin, Vilas Bôas et al.⁶

verified that the molar ratio between fusel oil and caprylic acid was a critical factor for attaining a high yield of isoamyl caprylate, requiring an amount of caprylic acid in the order of 1.5 times that of fusel oil. This similarity can be attributed to the hydrophobic character of both supports (STY-DVB and SiO₂-cyclodextrin) and partition coefficient values attained for these immobilized biocatalysts.

Biolubricant synthesis in a continuous run

To determine the role of water on the continuous enzymatic synthesis of isoamyl oleate, initially, the PBR was run without using any strategy to remove the formed water and results are shown in Figure 3. As it can be observed, the steady-state was reached in 12 h (less than 2 space-times), and the isoamyl oleate formation remained stable in $0.75 \pm 0.08 \text{ mol L}^{-1}$ ($649.69 \pm 32.60 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{ester}} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) up to 24h. Then, a gradual decreased in the isoamyl oleate formation was verified, attaining concentration lower than 0.34 mol L^{-1} at 48 h. After this point, there was an increase of both starting materials concentrations and decrease in the ester formation. Such behavior was expected due to the accumulation of water within the PBR (water levels increased from 0.05 to 0.29 %) after 48 h run, which changed the medium polarity and shifted the chemical equilibrium towards the ester hydrolysis. Although low operational stability was observed, the productivity achieved was about 65 times higher than that attained under batch run.

Figure 3

In esterification reactions, the adsorption of water molecules generated during the reaction is important for maintaining the active three-dimensional structure of lipase.^{12,34} However, high water retention capacity can led to a decrease of catalytic activity due to a possible increase of partition of short-chain alcohols to the biocatalyst microenvironment, thus, drastically reduced the acyl-enzyme complex formation, as aforementioned, due to a

possible reduction of oleic acid molecules partition from the bulk reaction to the active sites of immobilized ROL molecules – creation of a more hydrophilic microenvironment.³⁵ Although an hydrophobic support (STY-DVB resin) has been used for the biocatalyst preparation, the water accumulation was due to its interaction with immobilized ROL molecules on both external and internal support surfaces. This accumulation could also accelerate possible desorption of ROL molecules from the support surface, thus leading to a decrease of catalytic activity.

Therefore, an approach was attempted to avoid the reaction reversibility using molecular sieves as a dehydrating agent. In this experimental strategy, the continuous esterification reaction was carried out in two-stage packed bed reactor coupling with a molecular sieves column for water extraction (Figure 1). By using this experimental outline, it was possible to replace the saturated molecular sieves by regenerated one every two space-times, so that the second column was fed with medium containing much lower water contents. This allows maintaining favorable conditions to sustain the reaction direction to the ester synthesis. As can be verified in Figure 4, the water level in the first column reactor was gradually increased during the course of the reaction while in the second column the water level remained almost constant to levels lower than 0.4%, which favored the ester formation.

Figure 4

By using a flow rate of 1.6 mL h^{-1} (space-time= 10.2 h), the steady state was attained in 12h, and the ester concentration remained at an average $0.93 \pm 0.06 \text{ mol L}^{-1}$ up to 72 h operation, following by gradual decreasing after this point (Figure 5). This experimental set up showed to be more stable allowing to run the system under steady-state conditions for 3 days ($292.20 \pm 18.46 \text{ } \mu\text{mol}_{\text{ester}} \text{ g}^{-1} \text{ min}^{-1}$), in contrast with one day observed with the one stage reactor (control).

Figure 5

It is worthwhile to notice the fact that these reactions were carried out using fixed conditions and therefore these results must be taken as an indicative trend. Due to the complex mechanism of esterification reactions of long chain unsaturated carboxylic acid, such as oleic acid, with secondary alcohol, such as isoamyl alcohol, further study should be carried taking into consideration thermodynamic model to bring more stable reaction system.

Biocatalyst operational stability

High operational stability of the biocatalyst is required for industrial use of lipase-catalyzed reactions under continuous operation. The biocatalyst stability in PBRs is dependent of many factors, such as leakage of the enzyme from the support, obstruction of the pores for sludge or byproducts, support loss for attrition and obstruction of the packed bed, causing a bypass.³⁶ In esterification reactions, as already discussed, the water contents in the bulk reaction imposed an additional limiting factor.²²

Table 1 summarizes the half-life time ($t_{1/2}$) and inactivation constants (k_d) of the immobilized biocatalyst estimated for each experimental set up (one stage and two-stages PBR).

Table 1

These parameters were determined by fitting the experimental data of continuous ester synthesis to a first-order inactivation kinetic model.³⁷ k_d values were determined from the slope of the relative activity and reaction time (Figure 6). Interestingly, high correlation coefficients ($R^2 > 0.98$) were obtained for both experimental set up (control run and PBR in series with water column extractor), thus showing that this model can be successfully used to describe the enzyme inactivation.

Figure 6

The results showed that molecular sieves plays an important role on the reaction progress acting as receptor agent of the water formed as by-product. In addition, the polarity of the reaction medium is an important factor for the partitioning of water between the liquid and solid phases, which can be affected by the biocatalyst stability when insufficient amounts of molecular sieves were used. It is clear from the results that the water column extractor is a potential alternative to maintain stable the reactor operation, revealing a biocatalyst half-life of 179.6 hours, which is about three times higher than that attained in the single bed packed reactor.

Ester properties

The product mixture was composed of esters derived from fusel oil fraction, unreacted oleic acid and fusel oil fraction. To obtain pure ester product, the product mixture was treated to remove the remained starting materials.

ATR-FTIR spectroscopy analysis was used to identify the organic functions of reactants (fusel oil and oleic acid) and the majority product (isoamyl oleate) and their spectra are illustrated in Figure 7 a-c.

Figure 7 a-c

According to the first spectrum, fusel oil presents an intense band at 3320 cm^{-1} which is attributed to the OH group, confirming the presence of alcohols. The bands between 2955 and 2871 cm^{-1} correspond to the vibration of symmetrical and asymmetrical stretching of C-H methyl and methylene groups and the band at 1055 cm^{-1} is attributed to the C-O single bond stretching vibration of a primary alcohol. In the second spectrum (oleic acid), the intense band around at 2971 cm^{-1} is due to stretching of C-H overlapped to O-H bond, whereas the stretching vibrational of carbonyl group from the carboxylic moiety was observed at 1707 cm^{-1} . The OH presents in isoamyl alcohol was not detected in ATR-FTIR spectrum of

isoamyl oleate (third spectrum), which confirms the high purity of the product. Moreover, the intense band at 1737 cm^{-1} corresponds to carbonyl group of the ester formed after esterification reaction and the bands at 1244 and 1167 cm^{-1} to the stretching vibrational of C(=O)O- group,¹² thus confirming the synthesis of isoamyl oleate.

The ester synthesis was also confirmed by ^{13}C NMR and ^1H NMR analysis as shown in Figure 8 (a-b). According to the ^{13}C NMR spectrum of the isoamyl oleate ester (Figure 8a), the peak of 174.00 ppm corresponds to the carbonyl group $[-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{OCH}_2-]$ from the ester structure. The presence of the ester was also confirmed by two specific hydrogen peaks that make up the triplet in the region between 2.25 to 2.30 ppm methylene group attached to the carbonyl group to radical ester $[-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{OCH}_2-]$, and two hydrogens that comprise the triplet in the region between the 4.06 to 4.11 ppm methylene group attached to the oxygen atom $[-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{OCH}_2-]$. The spectrum also shows other peaks in the region for the esters formed by the other alcohols present in fusel oil. The spectroscopic analysis (ATR-FTIR and NMR) confirmed the successful synthesis of isoamyl oleate.

Figure 8 a-b

In addition, the determined properties concerning the kinematic viscosity at $40\text{ }^\circ\text{C}$ ($6.95\text{ mm}^2\text{ s}^{-1}$), density (820.6 kg m^{-3}), viscosity index (171), and water content (0.06%) were similar to those described in literature for isoamyl oleate from fusel oil and trade products such as DB 32 type dicarboxylic acid ester.⁸

CONCLUSION

This work reports a practical evaluation for a potential production of biolubricant by esterification reaction on continuous flow. To control the formed water as byproduct a two-stage packed bed reactor coupled with a water column extractor was used. Under the conditions established, it was possible to attain productivity of $292.20 \pm 18.46\text{ }\mu\text{mol}$ isoamyl

oleate $\text{g}^{-1}\text{min}^{-1}$ and satisfactory operational stability of the biocatalyst ($t_{1/2} = 179.6$ h), demonstrating a good performance and the high potential of the tested experimental set up. The physico-chemical properties of the purified ester were very similar to those commercially available, thus suggesting that it may be used as a lubricant in industrial processes. In addition, these research findings indicated that careful process design, including the selection of reactor configuration, enzyme loading, lipase source, space-time and byproduct removal could strongly affect the efficiency of isoamyl oleate production.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grant number #2016/10636-8), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq (Process Number 404812/2013-9) and CAPES (Renata N. Vilas Bôas doctoral fellowship).

REFERENCES

- (1) Patil, A. G.; Koolwal, S. M.; Butala, H. D. Fusel oil: composition, removal and potential utilization. *Int. Sugar J.* **2002**, *104*, 51.
- (2) Manley, J. B.; Anastas, P. T.; Cue Jr, B. W. Frontiers in green chemistry: meeting the grand challenges for sustainability in R&D and manufacturing. *J. Clean. Prod.* **2008**, *16*, 743.
- (3) Madarász, J.; Németh, D.; Bakos, J.; Gubicza, L.; Bakonyi, P. Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor. *J. Clean. Prod.* **2015**, *93*, 140.
- (4) Kirdi, R.; Akacha, N. B.; Messaoudi, Y.; Gargouri, M. Enhanced synthesis of isoamyl acetate using liquid-gas biphasic system by the transesterification reaction of isoamyl alcohol obtained from fusel oil. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2017**, *22*, 413.
- (5) Anschau, A.; Aragão, V. C.; Porciuncula, B. D. A.; Kalil, S. J.; Burkert, C. A. V.; Burkert, J. F. M. Burkert, Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate, *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 2148.
- (6) Vilas Bôas, R. N.; Biaggio, F. C.; Giordani, D. S.; De Castro, H. F. Enzymatic synthesis of isopentyl caprylate using fusel oil as feedstock. *Quim. Nova.* **2017**, *40*, 541.
- (7) De Castro, H. F.; Moriya, R. Y.; Oliveira, P. C.; Soares, C. M. F. Fusel oil as precursor for aroma generation by biotransformation using lipase. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *77-79*, 817.

- (8) Dormo, N.; Belafi-Bako, K.; Bartha, L.; Ehrenstein, U.; Gubicza, L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. *Biochem. Eng. J.* **2004**, *21*, 229.
- (9) Ozgulsun, A.; Karaosmanoglu, F. Environmentally friendly lubricating oil candidate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, 77-79, 83.
- (10) Ozgulsun, A.; Karaosmanoglu, F.; Tuter, M. Esterification reaction of oleic acid with a fusel oil fraction for production of lubricating oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 105.
- (11) Hills, G. Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **2003**, *105*, 601-607.
- (12) Lage, F. A. P.; Bassi, J. J.; Corradini, M. C. C.; Toderó, L. M.; Luiz, J. H. H.; Mendes, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme Microb. Technol.* **2016**, *84*, 56.
- (13) Adlercreutz, P. Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chem. Soc. Rev.* **2013**, *42*, 6406.
- (14) Stergiou, P. Y.; Foukis, A.; Filippou, M.; Koukouritaki, M.; Parapouli, M.; Theodorou, L. G.; Hatziloukas, E.; Afendra, A. M.; Pandey, A.; Papamichael, E. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol Adv.* **2013**, *31*, 1846.
- (15) Sá, A. G. A.; Meneses, A. C.; Araújo, P. H. H.; Oliveira, D. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. *Trends Food Sci. Technol.* **2017**, *69* Part A, 95.
- (16) Dhake, K. P.; Thakare, D. D.; Bhanage, B. M. Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds. *Flavour Fragr. J.* **2013**, *28*, 71.
- (17) Khan, N. R.; Rathod, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. *Process Biochem.* **2015**, *50*, 1793.
- (18) Willing, A. Lubricants based on renewable resources—an environmentally compatible alternative to mineral oil products. *Chemosphere* **2001**, *43*, 89.
- (19) Rangheard, M-S.; Langrand, G.; Triantaphylides, C.; Barattit, J. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: application to the determination of lipase alcohol specificity. *Enzyme Microb. Technol.* **1992**, *14*, 966.
- (20) Gulati, R.; Arya, P.; Malhotra, B.; Prasad, A.K.; Saxena, R.K.; Kumar, J.; Watterson, A.C.; Parmar, V.S. Novel biocatalytic esterification reactions on fatty acids: synthesis of sorbitol 1(6) – monostearate. *Arkivoc* **2003**, *3*, 159.
- (21) Freitas, L., Silva, G. S., Santos, J. C., Oliveira, P. C., De Castro, H. F. Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. *Eur. Food Res. Technol.* **2011**, *233*, 743.

- (22) Yahya, A. R. M.; Anderson, W. A.; Moo-Young, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme Microb. Technol.* **1998**, *23*, 438.
- (23) Severac, E.; Galy, O.; Turon, F.; Pantel, C. A.; Condoret, J. S.; Monsan, P.; Marty, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme Microb. Technol.* **2011**, *48*, 61.
- (24) Alves, M. D.; Aracri, F. M.; Cren, É. C.; Mendes, A. A. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem. Eng. J.* **2017**, *311*, 1.
- (25) Santos, J. C.; De Castro, H. F. Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2006**, *22*, 1007.
- (26) Oliveira, P. C.; Alves, G. M.; Mei, L. H. I.; De Castro, H. F. Synthesis of butyl butyrate by microbial lipase immobilized onto styrene-divinylbenzene copolymer. *Quim. Nova* **2000**, *23*, 107.
- (27) Ghamgui, H.; Karra-Chaabouni, M.; Gargouri, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: a comparative study between n-hexane and solvent-free system. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 355.
- (28) Paula, A. V.; Nunes, G. F. M.; Silva J. L.; De Castro, H. F.; Santos, J. C. Screening of food grade lipases to be used in esterification and interesterification reactions of industrial interest. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2010**, *160*, 1146.
- (29) Sellami, M.; Aissa, I.; Frikha, F.; Gargouri, Y.; Miled N. Immobilized *Rhizopus oryzae* lipase catalyzed synthesis of palm stearin and cetyl alcohol wax esters: Optimization by response surface methodology, *BMC Biotechnol.* **2011**, *11*, 68.
- (30) Kharrat, N.; Ali, Y. B.; Marzouk, S.; Gargouri, Y. T.; Karra-Châabouni, M. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochem.* **2011**, *46*, 1083.
- (31) Ungcharoenwiwat, P.; H-Kittikun, A. Synthesis of wax esters from crude fish fat by lipase of *Burkholderia* sp. EQ3 and commercial lipases. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2013**, *90*, 359.
- (32) Ganguly, S.; Nandi, S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor, *Biochem. Eng. J.* **2015**, *102*, 2.
- (33) Levenspiel O. (2000) Chemical reaction engineering. Wiley, New York.
- (34) Lima, L. C. D.; Peres, D. G. C.; Mendes, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde activated rice husk particles. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* **2018**, *41*, 991.
- (35) Páez, B. C.; Medina, A. R.; Rubio, F. C.; Moreno, P. G.; Grima, E. M. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme Microb. Technol.* **2003**, *33*, 845.

(36) Tamborini, L.; Fernandes, P.; Paradisi, F.; Molinari, F. Flow bioreactors as complementary tools for biocatalytic process intensification. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 73.

(37) Ramos, L.; Martin, L. S.; Santos, J. C.; De Castro, H. F. Combined use of a two-stage packed bed reactor with a glycerol extraction column for enzymatic biodiesel synthesis from macaw palm oil. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2017**, *56*, 1.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Operational stability of immobilized ROL on STY-DVB under continuous esterification reactions carried out in a PBR.

Experimental set up	Biocatalyst half-life time (h)	Inactivation constant (h ⁻¹)
Control reaction	59.3	0.012
PBR in series with water column extractor	179.6	3.85 x 10 ⁻³

Figure captions

Figure 1. Experimental set up used for esterification of fusel oil with oleic acid PBR in series connecting with water column extractor: 1 bath for temperature control; 2 feeding reservoir; 3 peristaltic pump; 4, 6 enzyme packed columns; 5 column with molecular sieves; 7 product reservoir; 8 (dotted line) water current; 9 (continuous line) feeding current.

Figure 2. Profile of the isoamyl alcohol (○) and oleic acid (□) consumption in the formation of isoamyl oleate (●) by enzymatically esterification reaction of fusel oil with oleic acid under batch run (alcohol to acid molar ratio of 1:1.5 and temperature of 45 °C) in the presence of solvent.

Figure 3. Profile of isoamyl oleate formation (●) in the esterification of fusel oil with oleic acid by immobilized lipase on STY-DVB running on continuous flow (control reaction, space time= 7.4 h; biocatalyst loading =2.6 g; alcohol to acid molar ratio of 1:1.5 and temperature of 45 °C in the presence of solvent).

Figure 4. Water contents in the two-stage packed bed reactor before (white column) and after (grey column) the water column extractor.

Figure 5. Profile of isoamyl oleate formation before (●) and after (○) the water column extractor in the esterification of fusel oil with oleic acid running on two-stage PBR (space time= 10.2 h; biocatalyst loading =5.2 g; alcohol to acid molar ratio of 1:1.5 and temperature of 45 °C in the presence of solvent).

Figure 6. Inactivation kinetics model fitted to the experimental points of the original activity of control reaction (■) and PBR in series with water column extractor (□), during the esterification continuous in PBR at 45 °C.

Figure 7. FTIR spectra of fusel oil, oleic acid and isoamyl oleate samples.

Figure 8. ^{13}C NMR and ^1H NMR spectra of the purified isoamyl oleate sample.

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4

Figure 5

Figure 6

Figure 7

Figure 8a

Figure 8b