

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

GABRIELLE POLICARPO DE ASSIS

**Estudo experimental e modelagem matemática da síntese de ésteres emolientes
catalisada por lipases imobilizadas em copolímero magnetizado**

Lorena
2023

GABRIELLE POLICARPO DE ASSIS

**Estudo experimental e modelagem matemática da síntese de ésteres emolientes
catalisada por lipases imobilizadas em copolímero magnetizado**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de Processos Catalíticos e Biocatalíticos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Larissa de Freitas

Versão Corrigida

Lorena
2023

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)

de Assis, G. P.
Estudo experimental e modelagem matemática da
síntese de ésteres emolientes catalisada por lipases
imobilizadas em copolímero magnetizado Lorena / G. P.
de Assis; orientador Prof^a. Dr^a. Larissa de
Freitas - Versão Corrigida. - Lorena, 2023.
75 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Engenharia Química na Área de
Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de
Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo.
2023

1. Biocatálise . 2. Ésteres emolientes. 3.
Mecanismo ping-pong bi-bi. 4. Imobilização de
lipases. 5. Copolímero magnetizado. I. Título. II. de
Freitas , Prof^a. Dr^a. Larissa , orient.

*Tudo que você faz, se tornará o que você merece!
Além de ser impossível agradar a todos, também é absolutamente desnecessário!*

AGRADECIMENTOS

Quero iniciar este texto agradecendo a Deus, por me dar a oportunidade, força e capacidade de entender que o tempo é dEle, que só Ele tem o poder de nos guiar e dar as graças quando estamos verdadeiramente prontos para gozar delas. Ele, e somente Ele, sabia do tamanho do meu sonho e o quanto é importante e satisfatório estar aqui, principalmente hoje, que escrevo essa mensagem de agradecimento.

Jamais pensei no momento exato que, enfim, realizaria meu sonho. Muito menos que seria dessa maneira tão incrível, linda, rica e poderosa, onde descobri uma Gabrielle que desconhecia, e a ela está atrelada uma força enorme. Além de conhecer pessoas que passaram e que talvez eu nunca mais veja, mas sei que lhes ensinei e me ensinaram coisas valiosas, não apenas dentro da academia.

Além disso, são necessários alguns agradecimentos particulares. À minha orientadora, companheira e amiga de luta, Dra. Larissa de Freitas, que me ensina todos os dias a ser uma pessoa/profissional melhor, que sede seu tempo para minhas dúvidas e me mostra todas as minhas capacidades, toda vez que penso em cair. Muito obrigada por aceitar entrar nessa jornada comigo e jamais me deixar sozinha. À minha irmã - coitada, que durante todo esse tempo não me largou, me ouviu, chorou comigo, me abraçou quando necessário, me deu a força que precisava e as palavras certas a serem ouvidas. Aos meus pais, que mesmo dentro de suas dificuldades, me apoiaram e me amaram, incondicionalmente. E a toda minha família, de sangue e de coração: amo vocês!

Esta também é para vocês, meus amigos, irmãos de vida, companheiros que de perto, de longe ou muito longe nunca me deixaram esquecer do meu tamanho e sempre foram compreensivos nas minhas ausências e transtornos. Entretanto, existe um amigo em específico que não posso deixar de citar. Meu filhinho, meu amor, meu companheiro de pesquisa, aquele que muitas vezes foi a presença necessária para minhas lágrimas de desespero não caírem, que segurou minha mão e me deu a força necessária, obrigada Vinícius. Agradeço a Deus, por ter me dado esse ser de luz de IC. Espero ter você ao meu lado no doutorado, pós-doutorado, futuramente sermos amigos de profissão, de vida etc. Te amo!

E novamente digo, obrigada Deus, sem o Senhor eu não estaria aqui, tendo a oportunidade de escrever esses agradecimentos e concluindo a primeira etapa dessa jornada dentro pós graduação e agradeço novamente a todos que diretamente e indiretamente fizeram parte desse sonho.

RESUMO

DE ASSIS, G.P. **Estudo experimental e modelagem matemática da síntese de ésteres emolientes catalisada por lipases imobilizadas em copolímero magnetizado.** 2023. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

O presente trabalho teve por objetivo sintetizar diferentes ésteres emolientes por rota enzimática via esterificação em meio isento de solvente empregando como biocatalisadores a lipase de *Penicillium camemberti* (Lipase G) e a lipase pancreática (LPP) imobilizadas em suporte híbrido magnetizado à base de estireno. O suporte poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol), STY-TEGDMA-M, foi sintetizado pela técnica de polimerização em suspensão e as lipases imobilizadas através da técnica de adsorção física. Foi realizada caracterização morfológica dos biocatalisadores sintetizados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia de infravermelho (FT-IR), constatando-se a presença da enzima no copolímero após o processo de imobilização. As atividades sintéticas dos biocatalisadores G-STY-TEGDMA-M e LPP-STY-TEGDMA-M demonstraram atividade de aproximadamente de 570 e 320 U g⁻¹, respectivamente. Posteriormente foi estudada a influência da temperatura nas sínteses dos ésteres emolientes: oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila. A síntese do oleato de butila apresentou conversões máximas empregando-se a lipase G já nas 12 primeiras horas, atingindo valores que variaram de 44 – 61%, dependendo da temperatura empregada. Observações diferentes foram obtidas para as reações catalisadas pela LPP, em que as maiores conversões só foram encontradas após 24h de reação (20 – 80%). Os maiores consumos do ácido oleico nas sínteses do oleato de hexila foram obtidos em 45° C empregando-se a lipase G, e em 50°C utilizando-se a LPP, atingindo 81% e 88% de conversão, respectivamente. Para a formação do oleato de octila foram obtidas conversões máximas de 37% empregando a lipase G, diferentemente da LPP que apresentou cerca de 80% de conversão. Esses resultados demonstram que para a LPP, a diferença no tamanho da cadeia carbônica do substrato praticamente não influenciou na conversão máxima das sínteses, diferentemente do observado para a lipase G, que apresentou melhor desempenho em substrato com tamanho de cadeia carbônica intermediária (ácido oléico + hexanol), dentre os substratos testados. Assim, o bioprocesso na qual sintetizou o oleato de hexila empregando como biocatalisador o G-STY-TEGDMA-M foi selecionado como o bioprocesso mais adequado. O teste de estabilidade térmica do derivado imobilizado selecionado mostrou que o G-STY-TEGDMA-M mantém cerca de 87 % de sua atividade inicial, após incubação por 4h a 60°C. Para o bioprocesso selecionado foi desenvolvida a modelagem cinética empregando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, nas quais foram obtidos diferentes parâmetros, tais como, as constantes de equilíbrio (K_{eq}) para as temperaturas estudadas e energias de ativação direta e inversa. Além disso, observou-se que as taxas de velocidade das reações diretas sofreram uma pequena influência com o aumento da temperatura reacional, já para a velocidade inversa não foi observada nenhuma alteração, mantendo-se o valor constante. O melhor ajuste de parâmetros apresentou valor de critério de Akaike corrigido (AIC_c) de 124,7762 e o desenvolvimento do método cromatográfico confirmou a formação do éster oleato de hexila. A relevância do trabalho está relacionada ao emprego do STY-TEGDMA-M para imobilização de lipases, a síntese dos diferentes ésteres avaliados e a abordagem utilizada na construção do modelo cinético enzimático.

Palavras-chave: Éster emoliente. Lipase imobilizada. Copolímero magnetizado. Temperatura. Parâmetros cinéticos e termodinâmicos. Modelagem matemática. Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.

ABSTRACT

DE ASSIS, G.P. **Experimental study and mathematical modeling of emollient ester synthesis catalyzed by immobilized lipases on magnetized copolymer.** 2023. 75p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The present study aimed to synthesize different emollient esters through an enzymatic pathway via solvent-free esterification, utilizing the lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) and pancreatic lipase (LPP) immobilized on a magnetized hybrid styrene-based support. The support, poly(styrene-co-triethylene glycol dimethacrylate), STY-TEGDMA-M, was synthesized using the suspension polymerization technique, and the lipases were immobilized using the physical adsorption technique. Morphological characterization of the synthesized biocatalysts was conducted using scanning electron microscopy (SEM) and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), confirming the presence of the enzyme in the copolymer after the immobilization process. The synthetic activities of the G-STY-TEGDMA-M and LPP-STY-TEGDMA-M biocatalysts demonstrated activities of approximately 570 and 320 U g⁻¹, respectively. Subsequently, the influence of temperature on the synthesis of emollient esters, including butyl oleate, hexyl oleate, and octyl oleate, was investigated. The synthesis of butyl oleate exhibited maximum conversions using Lipase G within the first 12 hours, reaching values ranging from 44% to 61%, depending on the temperature employed. Different observations were obtained for reactions catalyzed by LPP, where the highest conversions were only achieved after 24 hours (20% to 80%). The highest consumption of oleic acid in the synthesis of hexyl oleate was achieved at 45°C using Lipase G and at 50°C using LPP, reaching 81% and 88% conversion, respectively. For the formation of octyl oleate, maximum conversions of 37% were obtained using Lipase G, whereas LPP exhibited approximately 80% conversion. These results demonstrate that, for LPP, the difference in the carbon chain length of the substrate had little influence on the maximum conversion of the syntheses, unlike what was observed for Lipase G, which performed better with substrates of intermediate carbon chain length (oleic acid + hexanol) among the tested substrates. Thus, the bioprocess that synthesized hexyl oleate using G-STY-TEGDMA-M as the biocatalyst was selected as the most suitable. The thermal stability test of the selected immobilized derivative showed that G-STY-TEGDMA-M retained about 87% of its initial activity after incubation for 4 hours at 60°C. For the selected bioprocess, kinetic modeling was developed using the Ping-Pong Bi-Bi mechanism, from which various parameters were obtained, including equilibrium constants (K_{eq}) for the studied temperatures and activation energies for both the forward and reverse reactions. Additionally, it was observed that the forward reaction rates experienced a slight influence with increasing reaction temperature, while the reverse reaction rate remained constant. The best parameter fit yielded a corrected Akaike information criterion (AIC_C) value of 124.7762, and chromatographic analysis confirmed the formation of hexyl oleate. The significance of this work is related to the use of STY-TEGDMA-M for lipase immobilization, the synthesis of various evaluated esters, and the approach employed in constructing the enzymatic kinetic model.

Keywords: Emollient ester. Immobilized lipase. Magnetized copolymer. Temperature. Kinetic and thermodynamic parameters. Mathematical modeling. Ping-Pong Bi-Bi mechanism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Processos de imobilização de enzimas em suportes sólidos.....	23
Figura 2 - Esquema representativo do copolímero de STY-TEGDMA	28
Figura 3 - Reação de Esterificação entre ácido carboxílico e álcool: (a) ácido oleico + butanol; (b) ácido oleico + hexanol; (c) ácido oleico + octanol.....	29
Figura 4 - Mecanismo cinético Ping-Pong Bi-Bi	33
Figura 5 - Fluxograma ilustrativo das principais etapas do trabalho realizado.....	34
Figura 6 - Sistema experimental utilizado na síntese dos suportes poliméricos.	38
Figura 7 - Imobilização das lipases no suporte magnetizado: (a) Derivado imobilizado embebido em heptano; (b) Derivado imobilizado após secagem.....	40
Figura 8 - Micrografias obtidas pelo MEV: (a) Lipase G livre com aumento de 5000 x; (b) Lipase pancreática livre com aumento de 5000 x; (d) G-STY-TEGDMAM com aumento de 1000 x e (e) LPP-STY-TEGDMA-M com aumento de 1000 x.....	46
Figura 9 - Espectros de FT-IR das lipases livres e dos biocatalisadores sintetizados: Lipase G (magenta), Lipase pancreática (vermelho), G-STY-TEGDMA-M (azul); LPP-STY- TEGDMA-M (verde).	47
Figura 10 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de butila empregando diferentes biocatalisadores na faixa de temperatura 35- 55 °C (10% m/v de biocatalisador e agitação de 150 rpm): (a) G-STY-TEGDMA-M; (b) LPP-STY-TEGDMA-M.	49
Figura 11 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de hexila empregando diferentes biocatalisadores na faixa de temperatura 35- 55 °C (10% m/v de biocatalisador e agitação de 150 rpm): (a) G-STY-TEGDMA-M; (b) LPP-STY-TEGDMA-M.	52
Figura 12 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de octila empregando diferentes biocatalisadores na faixa de temperatura 35-	

55 °C (10% m/v de biocatalisador e agitação de 150 rpm): (a) G-STY-TEGDMA-M;
(b) LPP-STY-TEGDMA-M..... 53

Figura 13 - Atividade residual da lipase G imobilizada em STY-TEGDMA-M quando exposta a 60°C..... 55

Figura 14 - Resultados obtidos para a síntese do oleato de hexila empregando G-STY-TEGDMA-M como catalisador para a faixa de temperatura (35 - 55°C). Dados obtidos experimentalmente: (•) EXP e para o Ajuste obtido pelo modelo (—) MOD.
..... 57

Figura 15 - Cromatogramas obtidos da síntese do oleato de hexila empregando o biocatalisador G-STY- TEGDMA-M a 45°C..... 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estudos empregando lipases imobilizadas em diferentes suportes e métodos de imobilização, visando à obtenção de diversos produtos.....	24
Tabela 2 - Estudos realizados para síntese de ésteres via rota enzimática empregando lipases imobilizadas em suportes poliméricos.	30
Tabela 3 - Equipamentos utilizados durante realização do trabalho.	36
Tabela 4 - Proporção mássica utilizada na síntese do copolímero magnetizado STY-TEGDMA-M com 30% (m/m) de monômero e 70% (m/m) de solvente.	39
Tabela 5 - Atividade catalítica e umidade dos biocatalisadores sintetizados e resultado do teste de Tukey.	48
Tabela 6 - Melhores ajustes de parâmetros obtidos por Silva et al. (2020) na construção do modelo cinético.	56
Tabela 7 - Valores do critério de Akaike corrigido (AIC_C) para os diferentes ajustes encontrados para a síntese do oleato de hexila empregando como biocatalisador G-STY-TEGDMA-M.	58
Tabela 8 - Formação do oleato de hexila obtido a partir do consumo do ácido oleico via cromatografia gasosa.....	61

LISTA DE ABREVIACES

gua UP	gua ultrapura
AIBN	Azobisisobutironitrila
Lipase G	Lipase de <i>Penicillum Camembertii</i>
LPP	Lipase Pancreática
TEGDMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
DVB	Divinilbenzeno
PVA	lcool polivinílico
STY	Estireno
STY-TEGDMA-M	Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno e dimetacrilato de trietilenoglicol
STY-DVB-G	Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno e divinilbenzeno
G-STY-TEGDMA-M	Lipase G imobilizada em Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno e dimetacrilato de trietilenoglicol
LPP-STY-TEGDMA-M	Lipase pancreática imobilizada em Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno e dimetacrilato de trietilenoglicol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1	Biocatálise e Tecnologia Verde	19
3.2	Lipases	20
3.3	Métodos de Imobilização.....	22
3.4	Suporte para imobilização	26
3.5	Ésteres.....	28
	3.5.1 Influência da temperatura no desempenho das lipases em reações de esterificação	30
3.6	Modelagem cinética para reações enzimáticas	31
	3.6.1 Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Materiais	35
	4.1.1 Síntese da Magnetita.....	35
	4.1.2 Síntese do Suporte	35
	4.1.3 Imobilização das Enzimas	35
	4.1.4 Síntese dos Ésteres.....	35
	4.1.5 Demais Reagentes.....	36
4.2	Equipamentos	36
4.3	Metodologia Experimental	37
	4.3.1 Síntese da magnetita por co-precipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+}	37
	4.3.2 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico.....	37
	4.3.3 Síntese do copolímero magnetizado à base de estireno.....	37
	4.3.4 Imobilização das lipases de <i>Penicillium camemberti</i> (Lipase G) e Lipase pancreática (LPP).....	39
	4.3.5 Síntese dos ésteres (oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila) em frasco agitado.....	40

4.4	Metodologia de Análise	41
4.4.1	Teor de umidade.....	41
4.4.2	Análise granulométrica	41
4.4.3	Dosagem da atividade sintética dos biocatalisadores.....	41
4.4.4	Dosagem de atividade hidrolítica dos biocatalisadores.....	41
4.4.5	Teste de Tukey	42
4.4.6	Caracterização dos biocatalisadores sintetizados.....	42
4.4.7	Acompanhamento das reações de esterificação	42
4.4.8	Estabilidade térmica do biocatalisador.....	43
4.4.9	Construção do modelo cinético enzimático aplicando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.....	44
4.4.10	Desenvolvimento do método cromatográfico para identificação do éster emoliente formado	45
5	RESULTADOS.....	46
5.1	Caracterização dos biocatalisadores sintetizados.....	46
5.2	Atividade enzimática dos biocatalisadores	48
5.3	Influência da temperatura na síntese dos ésteres oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila.....	49
5.2.1	Oleato de Butila.....	49
5.2.2	Oleato de Hexila.....	51
5.2.3	Oleato de Octila.....	52
5.4	Estabilidade térmica do biocatalisador G-STY-TEGDMA-M	54
5.5	Construção do modelo cinético aplicando mecanismo Ping-Pong Bi-Bi	56
5.6	Análise comprobatória da formação do éster oleato de hexila por cromatografia gasosa	59
6	CONCLUSÕES	62
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	64
	REFERÊNCIAS.....	65
	ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

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

Processos enzimáticos que empregam lipases como biocatalisadores, enzima pertencente a classe das hidrolases, tem se tornado alternativas tecnológicas promissoras, visto que possuem uma variedade de possibilidades de aplicações, tais como, em reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e hidrólise de óleos e gorduras, demonstrando elevada eficiência, alta seletividade e especificidade, gerando produtos com elevada qualidade e rendimento, quando comparado à catalisadores convencionais, além da possibilidade de recuperação e reutilização ao final do bioprocessamento (PEREIRA *et al.*, 2022; UTAMA *et al.*, 2019).

As enzimas quando em seu estado livre, solubilizam em determinados meios reacionais, possuem instabilidade térmica e dificuldade de recuperação, assim, a imobilização dessas enzimas faz-se necessária (DA SILVA *et al.*, 2020). A utilização desta técnica é uma alternativa para a solução desses problemas, visto que, imobilizadas as enzimas são passíveis de recuperação, ocorre a redução de possíveis inibidores do processo, eleva sua estabilidade enzimática e facilita a purificação do produto (CORTEZ *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019; SAMPAIO *et al.*, 2022).

Diferentes técnicas de imobilização são empregadas visando à obtenção de biocatalisadores com elevada atividade catalítica e estabilidade. A adsorção física que consiste na imobilização da enzima no suporte por meio de ligações de baixa energia, tais como interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e ligações iônicas (MILETIĆ; NASTASOVIĆ; LOOS, 2012), é o método mais utilizado, devido sua simplicidade e baixo custo. O método de imobilização por ligação covalente ocorre entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os presentes nos resíduos dos aminoácidos da enzima. Além destes, também podem ser empregadas as técnicas de imobilização por encapsulamento/confinamento da enzima ou por ligação cruzada para obtenção de um biocatalisador (DUTRA *et al.*, 2022; FACIN *et al.*, 2019; FURLANI *et al.*, 2020; SAMPAIO *et al.*, 2022).

Diferentes materiais podem ser utilizados como suporte, dependendo das propriedades requeridas, tais como, força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico/hidrofílico, capacidade de adsorção da enzima e custo operacional (BILAL *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2019). A utilização de copolímeros para a preparação de biocatalisadores vem se tornando uma alternativa promissora, visto que demonstram elevado desempenho em reações enzimáticas e possuem propriedades multifuncionais (BENTO *et al.*, 2017). Dentre estes, os híbridos poliméricos magnetizados tem se mostrado bastante interessantes para esta aplicação, pois apresentam vantagens como elevada área superficial específica, o que possibilita maior disponibilidade para imobilizar enzimas e maior interação com o meio reacional, além da facilidade de separação do biocatalisador, devido à possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração (HAJAR; VAHABZADEH, 2016; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; SHARMA *et al.*, 2014).

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

A imobilização de lipases em copolímeros magnetizados à base de estireno vem se tornando uma abordagem promissora, pois são matrizes de elevada hidrofobicidade, adequadas para imobilizar essa classe de enzimas, além de praticamente não absorverem água do meio reacional. Além disso, a recuperação do biocatalisador é facilitada por força magnética ao final da reação, evitando assim, a utilização de filtração, separação em coluna e centrifugação (DA SILVA *et al.*, 2020; ROSA *et al.*, 2020).

O agente reticulante utilizado no processo de síntese do suporte magnetizado influencia diretamente na imobilização da enzima. Na literatura são documentados diversos trabalhos que demonstram a ação dos diferentes biocatalisadores em reações de esterificação (BENTO *et al.*, 2017; DA SILVA *et al.*, 2020; RANGEL *et al.*, 2022; ROSA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2020), porém o uso do poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol) em síntese de ésteres emolientes ainda é pouco explorado. Contudo, Rosa *et al.* (2020), evidenciaram em sua pesquisa um elevado grau de hidrofobicidade e uma maior capacidade de absorção de solvente para esse copolímero, peculiaridades importantes para o processo de imobilização de lipases, além de boa

interação enzima/suporte necessária para a condução das reações, evidenciando assim, um alto poder catalítico em bioprocessos.

Assim, o presente estudo visou a síntese de ésteres emolientes (oleatos de butila, hexila e octila), que apresentam aplicações importantes como solubilizantes na indústria cosmética (em composições para cremes e loções), e como agentes lubrificantes em diferentes áreas como fármacos, cosméticos, detergentes, maquiagens, entre outros. As sínteses foram realizadas via esterificação enzimática em meio isento de solvente empregando como biocatalisadores as lipases de *Penicillium camemberti* (Lipase G) e Lipase pancreática (LPP) imobilizadas no suporte magnetizado à base de estireno, poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol) - (STY-TEGDMA-M), avaliando-se seu rendimento em diferentes temperaturas. Para o bioprocessos que apresentou o melhor desempenho para a formação dos ésteres emolientes foi construído um modelo cinético empregando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo o estudo da obtenção de ésteres emolientes via esterificação em meio isento de solvente empregando, como biocatalisador, lipase imobilizada em um suporte híbrido magnetizado à base de estireno (STY-TEGDMA-M). Visando encontrar a máxima conversão do bioprocessos, foram avaliadas diferentes condições de síntese, tais como, fonte de lipase, tipo de álcool e diferentes temperaturas. Posteriormente, a partir da condição selecionada, foi construído o modelo cinético baseado no mecanismo Ping-Pong Bi-Bi. Os seguintes objetivos específicos foram executados:

- Sintetizar o suporte polimérico à base de estireno empregando o agente reticulante dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), magnetizado por meio da coprecipitação dos íons do Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio alcalino;
- Imobilizar as lipases de *Penicillium camemberti* (Lipase G) e Lipase pancreática (LPP) no STY-TEGDMA-M empregando a técnica de adsorção física e quantificação da atividade catalítica dos biocatalisadores;
- Sintetizar os ésteres emolientes, oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila via esterificação, a fim de obter as melhores condições operacionais a partir da influência da temperatura na conversão final dos ésteres;
- Realizar o teste da estabilidade térmica do biocatalisador selecionado;
- Construir o modelo cinético baseado no mecanismo Ping-Pong Bi-Bi aplicado para o bioprocessos selecionado que apresentou o melhor desempenho para a síntese dos ésteres emolientes.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biocatálise e Tecnologia Verde

Tecnologia limpa e química verde são conceitos relacionados à sustentabilidade e redução dos impactos ambientais. A tecnologia limpa busca reduzir a poluição e o uso de recursos não renováveis, enquanto a química verde se concentra na produção de produtos químicos sustentáveis com geração de resíduos e efluentes de baixa toxicidade. Essas ações são importantes para minimizar os impactos negativos da exploração humana ao meio ambiente, além de gerar novas oportunidades de negócios e empregos nesses setores. No entanto, os custos relacionados à essas tecnologias ainda são o gargalo para sua utilização em alguns setores (CHEN *et al.*, 2020; FANTKE *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a biocatálise, também conhecida como catálise enzimática, é uma alternativa sustentável para obter diversos produtos, empregando enzimas como catalisadores nas reações químicas, substituindo os métodos químicos convencionais. Estudos vêm sendo realizados a fim de explorar diferentes aplicações e melhorar o desempenho das enzimas nos mais diversos bioprocessos (BENÍTEZ-MATEOS *et al.*, 2021; SAMPAIO *et al.*, 2022).

As enzimas são macromoléculas de proteínas utilizadas como catalisadores biológicos. Também chamada de biocatalisadores, são capazes de diminuir a energia de ativação, acelerando as reações sem serem consumidos (WANG; LAN; MA, 2020). A elevada atividade catalítica, a seletividade e a especificidade das enzimas as tornam interessantes para a utilização nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticos, quando comparadas à catalisadores convencionais (GEOFFRY; ACHUR, 2018b; WANG; LAN; MA, 2020).

Existem cerca de 6000 enzimas caracterizadas, porém apenas uma pequena parte é comercializada e produzida industrialmente. A Comissão de Enzima (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) classificou as enzimas em 7 grupos principais com base nas reações que catalisam, oxirredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases, ligases e translocases.

Hidrolases são enzimas que promovem a cisão (quebra) da ligação química de uma molécula na presença de água. Elas são responsáveis por uma variedade de processos biológicos, incluindo a digestão de alimentos e a degradação de materiais orgânicos no meio ambiente. Além disso, elas são importantes para a obtenção de muitos produtos industriais, como alimentos, biocombustíveis e fármacos (LIU; KOKARE, 2023; TADEVOSYAN *et al.*, 2022).

A classificação numérica das hidrolases segue a sigla EC (Enzyme Commission) seguida por quatro números que indicam a classe, subclasse, subgrupo e número de identificação da enzima. As hidrolases pertencem a classe 3, com subclasse e subgrupos específicos de acordo com o tipo de ligação que a enzima catalisa e o grupo funcional envolvido. Essa nomenclatura ajuda na identificação e categorização das enzimas com base em suas características e funções bioquímicas (MCDONALD, 2019; MCDONALD; TIPTON, 2023; PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE et al., 2020).

3.2 Lipases

As lipases (EC 3.1.1.3; triacilglicerol hidrolase) atualmente vem apresentando grande potencial industrial dentre as enzimas comerciais, pois apresentam caráter multifuncional em reações de catálise para processos sintéticos e hidrolíticos. Indústrias como a de cosméticos, farmacêuticas, alimentos, biodiesel, entre outras, estão constantemente desenvolvendo novas tecnologias com o intuito de ampliar as aplicações das lipases em seus processos, devido sua elevada especificidade para os substratos, estabilidade em diferentes meios reacionais, e versatilidade de aplicação. Além disso, possuem quimiosseletividade, esterosseletividade e regioseletividade, características que melhoram o rendimento e inibem a formação de subprodutos (DOS SANTOS *et al.*, 2021; SHARMA *et al.*, 2014).

As lipases possuem duas conformações diferentes, ativa e inativa, sendo seu estado ativo quando a sua chamada “tampa” está aberta, tornando o sítio ativo funcional e acessível ao substrato, ocorrendo a catálise. Já na conformação inativa a “tampa” está fechada, tornando o sítio ativo inacessível ao substrato, dificultando a ocorrência catálise. O sítio ativo da lipase é composto geralmente por histidina, serina, ácido glutâmico ou aspártico (KHAN *et al.*, 2017; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Abundantemente encontrada na natureza, as lipases podem ser adquiridas através de três diferentes fontes, microbiana, vegetal e animal, destacando-se a microbiana que é a mais utilizada em processos industriais e biotecnológicos. São capazes de hidrolisar espontaneamente ligações ésteres presentes em triacilgliceróis (TG), formando diacilgliceróis (DG), monoacilgliceróis (MG) e ácidos graxos livres (FFA). Além disso, são capazes de catalisar reações de esterificação, transesterificação, interesterificação e acidólise (BIDJOU-HAIOUR; KLAI, 2013; SAMPAIO *et al.*, 2022).

Embora as lipases tenham como seu principal substrato óleos e gorduras, algumas delas não são capazes de catalisar esse tipo de reação, como a lipase de *Penicillium camembertii*

(lipase G), que não demonstra atividade para triacilgliceróis (MENDES *et al.*, 2011). Já a lipase pancreática suína (LPP), possui ampla aplicação tanto em reações de hidrólise como de sínteses, apresentando elevada estabilidade térmica nesse meio reacional (GUIMARÃES *et al.*, 2018; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Outro fator que faz da LPP uma fonte de grande interesse industrial é seu custo mais acessível quando comparado aos custos das demais lipases disponíveis comercialmente para a mesma função. Entretanto, esse baixo custo está atrelado ao fato de não ser uma enzima pura, visto que, em sua formulação são encontradas também outras hidrolases como, esterases, amilases e proteases (MELANI; TAMBOURGI; SILVEIRA, 2020; MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012).

Apesar das vantagens apresentadas pela lipase, a sua utilização na forma livre e solúvel é pouco atrativa para processos industriais, devido a sua baixa estabilidade operacional e elevado custo do processo. Assim, suportes e metodologias de imobilização vêm sendo cada vez mais estudados e explorados, visando ampliar as aplicações e aprimoramentos de processos já estabelecidos, além da melhoria na estabilidade e possibilidade de recuperação e reutilização ao final do processo (GUIMARÃES *et al.*, 2018; LEI *et al.*, 2009; VESCOVI; DOS SANTOS; TARDIOLI, 2017).

Atualmente, vários estudos têm empregado lipases imobilizadas em suportes diversos para diferentes aplicações. Por exemplo, Vilas Bôas *et al.* (2018), imobilizaram a lipase G em polissiloxano-hidroxietilcelulose (SiO_2 – HEC) visando obter o laurato de isoamila, conseguindo uma conversão máxima de 82%. Silva *et al.* (2020), utilizaram a mesma lipase imobilizada em STY-DVB-M, poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, para catalisar a síntese do palmitato de isopropila, alcançando 83% de conversão. Em outro trabalho, De Lima *et al.* (2022), utilizando condições reacionais similares (tipo de lipase, agitação e temperatura reacional) que Silva *et al.* (2020), para a obtenção do esterato de isoamila, encontraram 87% de conversão da reação.

Em relação a utilização da lipase pancreática para a síntese de ésteres, pode-se citar o trabalho realizado por Pinto Brito *et al.* (2020), que imobilizaram essa lipase em carvão ativado para a obtenção do acetato de isoamila, obtendo cerca de 93% de conversão. Taghizadeh *et al.* (2021) também utilizaram a lipase pancreática imobilizada em zeolíticas de imidazólio (ZIF-90) para sintetizar o butirato de isoamila, alcançando 78% de conversão. Esses resultados demonstram o bom desempenho dessas lipases na obtenção de diferentes ésteres.

3.3 Métodos de Imobilização

Devido ao elevado custo das enzimas comerciais, a possibilidade de reutilização é imensamente importante e almejada. Com isso, a imobilização de enzimas é um método bastante atrativo, visto que ao estar acoplada a um suporte, a lipase tende a ter maior estabilidade e possibilidade de reutilização (REMONATTO *et al.*, 2022).

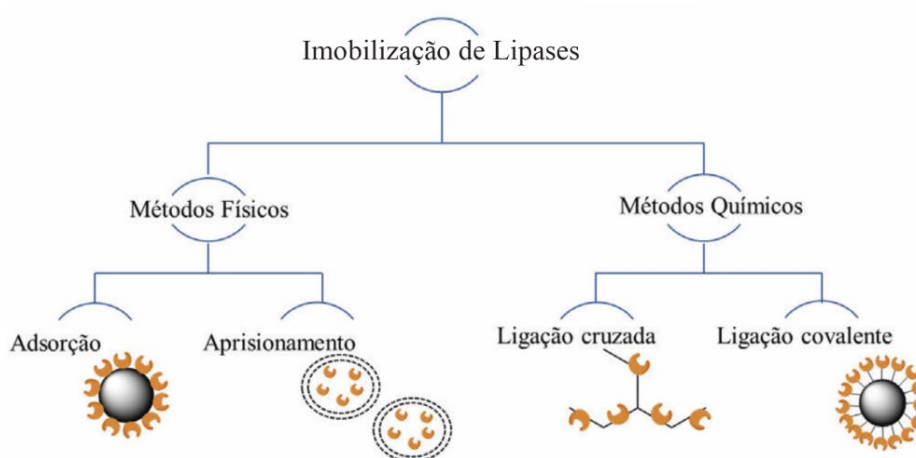
Dentre os diferentes métodos de imobilização, destaca-se o de adsorção física, que foi uma das primeiras técnicas desenvolvidas, e consiste em uma adsorção simples entre a enzima e o suporte sólido, apresentando-se como um método simples, rápido e de baixo custo (FURLANI *et al.*, 2020).

Outro método de imobilização bastante utilizado é o de ligação covalente, que consiste no emprego de um agente ativador que adiciona grupos funcionais ao suporte, aumentando a interação entre a enzima e o suporte através de uma ligação química, proporcionando maior estabilidade à enzima. No entanto, esse método pode reduzir a atividade catalítica da enzima, devido à possibilidade de alteração conformacional da mesma, além de ser um processo mais oneroso (RAFIEE; REZAEE, 2021; THANGARAJ; SOLOMON, 2019).

Outro método é a imobilização por encapsulamento ou aprisionamento, na qual a enzima é encapsulada em um material que age como uma proteção contra exposições externas, o que traz maior estabilidade ao biocatalisador, porém essa proteção pode limitar a interação entre a enzima e o substrato (ISMAIL; BAEK, 2020).

Existe também a imobilização por ligação cruzada, na qual não é empregado um suporte, e sim enzimas ligadas umas às outras, formando estruturas tridimensionais complexas, o que pode reduzir a estabilidade da enzima, diminuindo sua atividade catalítica (LÚCIA CARDOSO, 2009). A Figura 1 apresenta uma ilustração sobre os principais processos de imobilização de enzimas em suportes sólidos.

Figura 1 - Processos de imobilização de enzimas em suportes sólidos.



Fonte: Modificado (FURLANI et al., 2020).

A escolha do método de imobilização deve considerar as condições do processo, como tipo de reação, meio reacional, tipo de substrato e suporte e custo do processo de imobilização. Além disso, devem ser consideradas principalmente as necessidades específicas do processo, afinal, as lipases são aplicadas em diversas áreas, entre elas, a produção de alimentos e fármacos, que requerem maior atenção e cuidado durante o bioprocessamento e no produto final (ISMAIL; BAEK, 2020; JACOB; WAHAB; MAHAT, 2021; REMONATTO *et al.*, 2022).

A Tabela 1 apresenta diferentes trabalhos publicados que utilizaram lipases como biocatalisador aplicadas em diferentes bioprocessos.

Tabela 1 - Estudos empregando lipases imobilizadas em diferentes suportes e métodos de imobilização, visando à obtenção de diversos produtos.

Lipase	Suporte	Método de imobilização	Produto	Rendimento	Referência
<i>Mucor miehi</i>	Hidrogel de quitosana	Encapsulamento	Laurato de propila	Máxima conversão de 60% em 24h.	(VASSILIA DI; XENAKIS; ZOUMPANI OTI, 2018)
<i>Burkholderia cepacia</i>	SiO ₂ -PVA com partículas magnéticas de Fe ₃ O ₄	Ligação Covalente	Biodiesel	Máxima conversão de 96,5% em 72h.	(MIJONE <i>et al.</i> , 2020)
<i>Candida rugosa</i>	Partículas de polihidroxibutirato	Adsorção física e ligação cruzada	Acilgliceróis	Rendimento de 48% na produção de monoacilgliceróis	(BINHAYEE DING <i>et al.</i> , 2020)
<i>Candida antarctica</i>	Grânulos de resina de poliacrilato	Ligação covalente	Butirato de cinamila	Rendimento máximo de cerva de 87% em 24h.	(WAGHMA RE; CHATTERJI; RATHOD, 2017)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Casca de arroz	Ligação covalente	Oleato de cetila	Conversão máxima de 91,5% em 24h.	(LIMA; PERES; MENDES, 2018)
<i>Penicillium camemberti</i>	Divinilbenzeno	Adsorção física	Oleato de isoamila	Conversão máxima de 98,29% em 24h.	(VILAS BÔAS <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Próprio autor.

(continua)

(conclusão)

Tabela 1 - Estudos empregando lipases imobilizadas em diferentes suportes e métodos de imobilização, visando à obtenção de diversos produtos.

Lipase	Suporte	Método de imobilização	Produto	Rendimento	Referência
<i>Proteus vulgaris</i>	Beads de polisulfono	Ligação covalente	Biodiesel	Conversão de 99%, em 3 horas a 40 °C.	(GUPTA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Rhizopus microsporus</i>	Perlite	Adsorção	Oleato de etila	Rendimento próximo a 85% em 14 horas a 45°C.	(MARTÍNEZ-RUIZ <i>et al.</i> , 2018)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Palha de arroz magnetizada	Ligação covalente	Biodiesel	Rendimento próximo a 83% em 48 horas a 45°C.	(OTARI <i>et al.</i> , 2020)
<i>Penicillium camemberti</i>	poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnético	Adsorção física	Palmitato de isopropila	Conversão máximo de 51,91 % de em 12h a 45°C.	(SILVA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Aspergillus oryzae</i>	Alginato de cálcio	Encapsulamento	Acetato de isoamila	Rendimento de 87,22% a 70 °C.	(KIRDI <i>et al.</i> , 2017)
<i>Penicillium camemberti</i>	Estireno-divinilbenzeno	Adsorção física	Estearato de isoamila	Conversão máxima de 87,30% em 24h a 45°C	(DE LIMA <i>et al.</i> , 2022)

Fonte: Próprio autor.

3.4 Suporte para imobilização

O processo de imobilização de enzimas é considerado um fator muito importante para a obtenção de inúmeros produtos que empregam lipases como catalisadores. Assim, a busca por diferentes suportes capazes de aumentar a estabilidade catalítica da lipase, vem sendo cada vez mais investigada, visto que a porosidade do material, a área superficial e a hidrofobicidade, são características que podem alterar a performance do sistema imobilizado durante o processo catalítico e o produto alvo. Dessa forma, o suporte deve facilitar a interação entre o sítio ativo da lipase e as moléculas do substrato, de forma a minimizar os problemas de limitações de difusão que podem ocorrer (ISMAIL; BAEK, 2020).

Diversos materiais inorgânicos, orgânicos e híbridos estão sendo empregados como suportes de imobilização de enzimas. Os materiais inorgânicos, como dióxido de silício, óxidos de alumínio, zircônio e titânio demonstram excelente estabilidade e resistência mecânica. Materiais orgânicos, como quitosana, celulose, quitina, polímeros sintéticos e biopolímeros estão cada vez mais sendo explorados como suporte e vêm apresentando boa eficiência. Existem também outros materiais como minerais, materiais de carbono, nanopartículas, entre outros (MEENA *et al.*, 2021; ZDARTA *et al.*, 2018).

Recentemente, os suportes híbridos magnetizados têm sido de grande interesse científico para a utilização em imobilização de enzimas. Dentre estes se destacam os materiais híbridos orgânicos-inorgânicos, compostos por uma matriz polimérica orgânica e partículas inorgânicas incorporadas à matriz, proporcionando características únicas ao suporte. Esses materiais são facilmente preparados e modificados, além de apresentarem uma ampla gama de possibilidades de diferentes combinações, gerando materiais únicos com propriedades específicas, como elevada estabilidade e resistência mecânica (GRIGORAS, 2017; ISMAIL; BAEK, 2020).

Os suportes poliméricos vêm sendo avaliados como suportes sólidos para imobilização de enzimas devido à possibilidade de controle de alguns parâmetros importantes para esta finalidade, como tamanho de partícula, porosidade, tamanho e volume de poros. Além disso, há uma ampla variedade de polímeros disponíveis que apresentam elevada estabilidade química e térmica (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

Nesse contexto, destaca-se também a utilização de copolímeros para a imobilização de enzimas, cujo diferencial está no fato de apresentarem dois meros diferentes em sua cadeia. Esta é uma vantagem desses materiais, visto que, dependendo do monômero e da quantidade empregada na formulação do copolímero, o mesmo pode apresentar propriedades físico-

químicas e mecânicas diferenciadas, diretamente influenciadas pelo monômero escolhido (DOS SANTOS *et al.*, 2021).

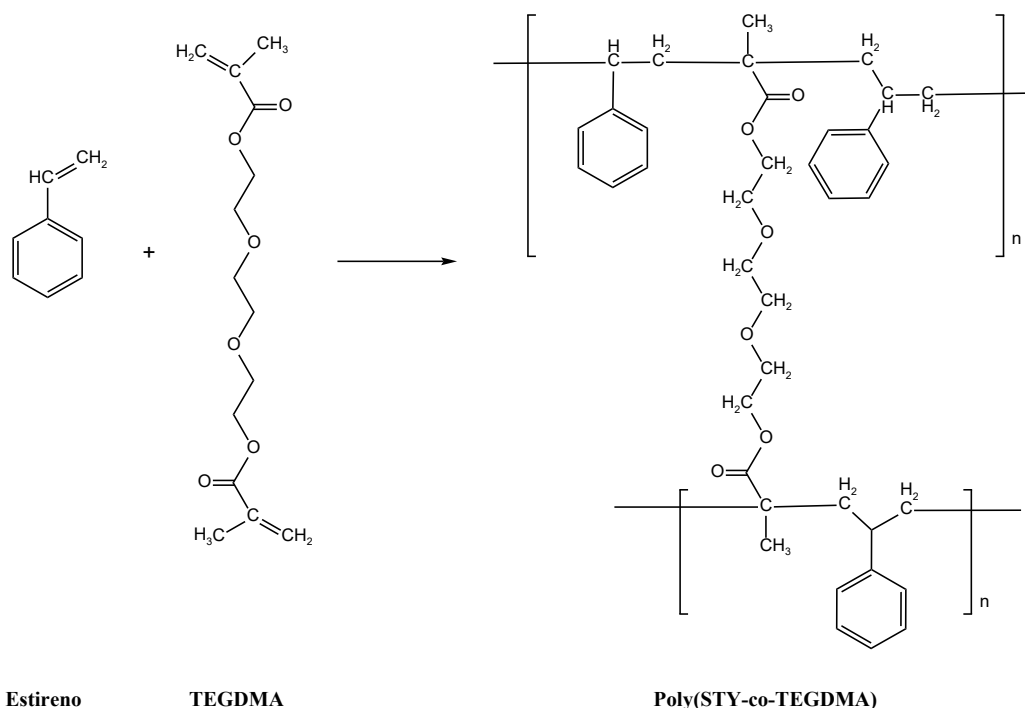
Os copolímeros podem ser de origem sintética ou natural, em que os naturais são encontrados como polissacarídeos, ácidos nucleicos, látex, proteínas e algodão. Já os sintéticos são oriundos de combustíveis fósseis, polipropileno, polietileno, poliestireno, entre outros (ABHILASH; THOMAS, 2017). Além disso, os sintéticos podem ser formulados por diferentes métodos, como a polimerização em massa, em solução, por emulsão e suspensão (LOVELL; SCHORK, 2020).

A técnica da polimerização por suspensão emprega um agente de suspensão para estabilizar a dispersão do monômero utilizado em água, formando pequenas gotas. Além disso, essa técnica utiliza água ao invés de solventes como meio de dispersão, possui elevada dispersão de calor e facilidade de recuperação do solvente, quando comparada à polimerização em solução (LOVELL; SCHORK, 2020; PENG *et al.*, 2021).

Diferentes copolímeros obtidos por polimerização em suspensão vêm sendo estudados pelo grupo de pesquisa de Biocatálise da EEL-USP, e tem demonstrado bom desempenho na produção de matrizes para imobilização de lipases utilizando diferentes reticulantes, tais como, divinilbenzeno (DVB), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA). Vale ressaltar que as matrizes sintetizadas possuem características magnéticas, visto que durante a polimerização é incorporada magnetita obtida a partir da coprecipitação de íons férricos.

Rosa (2019), estudou diferentes condições de síntese de copolímeros magnetizados obtidos a partir de estireno e diferentes agentes reticulantes. Com base nesse estudo desenvolvido em nosso grupo de pesquisa, foi selecionado o dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) como agente reticulante para a obtenção da matriz de imobilização do presente estudo, para posterior imobilização de lipases e aplicação na síntese de diferentes ésteres. A Figura 2 apresenta a estrutura do copolímero obtido a partir da polimerização em suspensão.

Figura 2 - Esquema representativo do copolímero de STY-TEGDMA



Fonte: (ROSA, 2019).

3.5 Ésteres

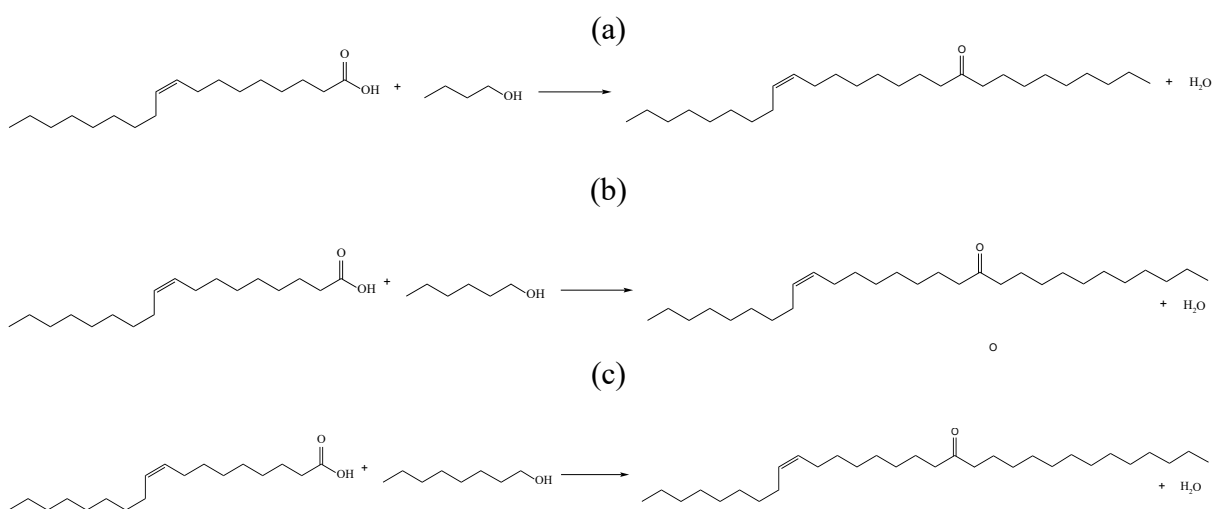
Os ésteres são compostos orgânicos formados a partir da reação entre um ácido carboxílico e um álcool. Possuem uma ampla variedade de aplicações industriais, incluindo a produção de sabores e fragrâncias, plásticos, solventes e produtos farmacêuticos. São considerados substâncias que apresentam excelente desempenho técnico associado a propriedades ecológicas satisfatórias, pois são compostos de fácil degradação e possuem baixa toxicidade. Essas características fazem com que os ésteres sejam cada vez mais empregados em diferentes setores industriais, contribuindo para a redução dos impactos ambientais e para a promoção da sustentabilidade (ABDELRAHEEM *et al.*, 2019; LAGE *et al.*, 2016; VILAS BÔAS; DE CASTRO, 2022).

Existem diferentes tipos de ésteres, que podem ser empregados em diferentes ramos industriais, como ésteres aromáticos, ésteres emulsificantes, ésteres emolientes, entre outros. Ésteres emolientes são obtidos por álcoois e ácidos graxos com cadeias longas de 12 carbonos ou mais e empregados em produtos cosméticos, como cremes e loções, devido às suas propriedades emolientes e hidratantes para a pele. Esses ésteres são capazes de formar uma

camada protetora na superfície da pele, reduzindo a perda de água transepidérmica e proporcionando uma sensação de maciez e suavidade, além de um melhoramento da aparência da pele em função da suavização das células escamosas (DUPRAT-DE-PAULE *et al.*, 2018; GOUSSARD; AUBRY; NARDELLO-RATAJ, 2022).

A Figura 3 mostra uma reação de esterificação dos ésteres sintetizados pelo presente estudo: oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila.

Figura 3 - Reação de Esterificação entre ácido carboxílico e álcool: (a) ácido oleico + butanol; (b) ácido oleico + hexanol; (c) ácido oleico + octanol.



Fonte: próprio autor

Quando obtidos por rota enzimática, os ésteres são catalisados por lipases, sendo uma alternativa ambientalmente amigável aos ésteres derivados de petróleo, já que são biodegradáveis e não tóxicos.

O oleato de butila é um éster produzido a partir da reação química entre o ácido oleico e o butanol. Esse éster possui excelente solvência e é amplamente utilizado na indústria cosmética em produtos como batons, lubrificantes e solubilizantes para cremes e condicionadores, além de serem utilizados como lubrificante antiestático em indústrias têxteis (VICCHEM, 2023).

Os oleatos de hexila e octila são ésteres emolientes resultantes da reação do ácido oleico com hexanol e octanol, respectivamente. Esses compostos possuem propriedades lubrificantes que ajudam a hidratar e suavizar a pele, sendo também utilizados em produtos para cuidados

com o cabelo (SANTOS, 2015). Na Tabela 2 estão listados alguns trabalhos sobre a síntese de ésteres via rota enzimática empregando lipases imobilizadas em suportes poliméricos.

Tabela 2 - Estudos realizados para síntese de ésteres via rota enzimática empregando lipases imobilizadas em suportes poliméricos.

Éster	Substrato	Biocatalisador	Conversão (%)	Referencia
Palmitato de Isopropila	Ácido palmítico e álcool isopropílico	G-STY-DVB-M	52	(SILVA <i>et al.</i> , 2020)
Oleato de Octila	Ácido oleico e 1-octanol	CALB-STY-EGDMA-M	57	(RANGEL <i>et al.</i> , 2022)
Miristato de isopropila	Ácido mirístico e álcool isopropílico	CALB-STY-DVB-M	80	(SILVA <i>et al.</i> , 2018)
Oleato de 2-etil hexila	Ácido oleico e 2-etil-hexanol	CALB-STY-DVB-M	61	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2021)

Fonte: Próprio autor.

É importante salientar que os ésteres sintetizados no presente estudo via rota enzimática, são poucos citados na literatura, principalmente o oleato de hexila. Além disso, estudos que explorem o desempenho das lipases empregadas no presente trabalho, em diferentes temperaturas também são escassos.

3.5.1 Influência da temperatura no desempenho das lipases em reações de esterificação

Lipases, quando empregadas como catalisadores em diferentes meios reacionais, podem ser influenciadas por alguns fatores, tais como pH, tipo de substrato, tipo de solvente e temperatura. Sabe-se que, enzimas em geral, quando expostas a temperaturas elevadas podem sofrer uma redução na sua atividade catalítica, em função de alterações conformacionais da proteína, além de afetar a interação entre a enzima e o substrato, favorecendo o rompimento do complexo intermediário ES (enzima-substrato). É válido ressaltar que em sua forma livre, essa queda é ainda mais acentuada (BANSODE; RATHOD, 2017; GEOFFRY; ACHUR, 2018a).

Com isso, o cuidado com a temperatura na qual a lipase será exposta durante o bioprocessamento é crucial, visto que, o aumento da temperatura pode prejudicar sua ação catalítica (MOKHTAR *et al.*, 2020; SOUSA *et al.*, 2021). Além disso, em reações de síntese de ésteres empregando lipases como catalisadores, a temperatura do meio reacional tem efeito direto na

taxa de reação, na estabilidade da enzima e na solubilidade do substrato, já que a viscosidade do meio diminui conforme a temperatura aumenta, com isso, as limitações relacionadas à transferência de massa diminui (STERGIOU *et al.*, 2013).

Dessa forma, ao empregar um substrato (ácido e álcool) de cadeia mais longa, deve-se levar em consideração a possibilidade da utilização de temperaturas mais elevadas, principalmente em meios isentos de solvente, sendo fundamental a imobilização da lipase, o que a torna mais estável, já que cada tipo específico de lipase detém de especificidades e de uma temperatura ótima de processo (BANSODE; RATHOD, 2017; GEOFFRY; ACHUR, 2018a; SERRANO-ARNALDOS *et al.*, 2020).

3.6 Modelagem cinética para reações enzimáticas

A modelagem matemática de reações enzimáticas pode ser representada por equações que descrevem a cinética reacional. Essas equações levam em consideração a concentração do substrato, da enzima e dos produtos, bem como as constantes de velocidade e o mecanismo da reação (GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2022). A modelagem auxilia a ampliação de escala do processo, pois prevê o seu comportamento em diferentes condições e identifica possíveis problemas que eventualmente possam ocorrer antes da implementação em larga escala (BLÖBAUM; HARINGA; GRÜNBERGER, 2023).

É sabido que a interação entre a enzima e o substrato é determinante para a cinética da reação, gerando constantes de velocidades diferentes, dependendo da condição na qual a enzima é exposta. Essas interações são complexas e podem envolver mais de um substrato, como para a síntese de ésteres, em que são empregados dois substratos (ácido e álcool), formando dois produtos (ULUSU, 2015).

O mecanismo cinético pode ocorrer de forma sequencial ou não sequencial. Para os sequenciais, os substratos se ligam à enzima de forma única, e a reação prossegue para formar produtos que são liberados pela enzima. Esse mecanismo pode ser subdividido em reações aleatórias ou ordenadas. Em reações aleatórias, não importa a ordem na qual os substratos se ligam, diferentemente das reações ordenadas, em que um substrato deve se ligar à enzima antes que o segundo substrato o faça (ULUSU, 2015).

Os modelos cinéticos podem ser empregados na otimização de reações enzimáticas por meio do ajuste das condições experimentais, objetivando-se melhorar a produtividade e reduzir os custos do processo. Eles também ajudam a identificar compostos que venham afetar o

desempenho da enzima durante a catálise, como por exemplo, inibidores ou ativadores (ULUSU, 2015). Além disso, são úteis para a simulação de processos, pois prevêem o efeito das mudanças nas condições operacionais, como temperatura, pH, concentração de substrato, concentração da enzima e a conversão dos substratos em produtos.

Assim, devido aos diferentes fatores que podem influenciar na cinética de uma reação enzimática, são encontrados na literatura estudos que empregam variados mecanismos para a construção da modelagem cinética, na qual, compreendem diferentes condições e inibições. Dentre eles, existe o Ping-Pong Bi-Bi, que considera fatores como razão molar, proporção mássica de biocatalisador e interação enzima/substrato, fatores esses, importantes para melhor entendimento do comportamento cinético reacional do bioprocessamento.

3.6.1 Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi

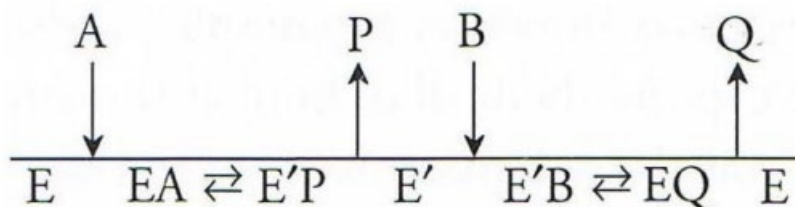
A maioria dos modelos enzimáticos é baseada em uma cinética simples de *Michaelis-Menten*, que é válida para a maior parte das reações enzimáticas (STERGIOU *et al.*, 2013). No entanto, ao longo do tempo, diversos outros mecanismos foram desenvolvidos com base no modelo proposto por *Michaelis-Menten*, visando a incorporação de outros fatores que podem influenciar a velocidade da reação enzimática (BHANDARI *et al.*, 2013). Dessa forma, no modelo cinético podem ser consideradas inibições na atividade enzimática, causadas pela interação da enzima com o substrato ou acarretadas pela formação de produtos na reação (reversível ou irreversível) (LOPRESTO *et al.*, 2014).

Um exemplo é o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, que é aplicado para a modelagem cinética das reações de esterificação mediadas por lipases, na qual ocorre uma reação entre dois reagentes (ácido e álcool) para a formação de dois produtos (éster e água) (SILVA *et al.*, 2020) e que foi selecionado para o desenvolvimento do presente estudo. Este mecanismo envolve a formação de um intermediário acil, no qual uma molécula de álcool é incorporada, seguida pela liberação de éster e água. A equação cinética considera a possibilidade de inibição por ambos os substratos. Neste modelo, os parâmetros cinéticos K_m , K_i e V_{max} são considerados essenciais para estudos de ampliação de escala e projeto de reatores, sendo que o K_m indica a afinidade do biocatalisador pelo substrato, k_i expressa os efeitos inibitórios do substrato sobre as enzimas e V_{max} a velocidade máxima obtida no bioprocessamento (LOPRESTO *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2021).

Dentre os diferentes tipos de inibição enzimática que já foram descritos em estudos de bioquímica e enzimologia, a inibição competitiva é bastante relatada no mecanismo Ping-Pong

Bi-Bi. Esse tipo de inibição ocorre quando ambos os substratos, ou um substrato e um solvente, se ligam reversivelmente ao sítio ativo da enzima, mas não simultaneamente (ULUSU, 2015). A Figura 4 apresenta o mecanismo cinético Ping-Pong Bi-Bi.

Figura 4 - Mecanismo cinético Ping-Pong Bi-Bi



Fonte: (PRICE et al. 2014)

De acordo com o mecanismo, (A) é o primeiro substrato que é ligado a lipase (E) formando um complexo enzima-substrato (EA), sendo gerado o primeiro produto (P). Assim, a enzima é modificada quimicamente, sendo liberada na forma modificada (E') e que se liga ao segundo substrato (B), formando o complexo (E'B), gerando o complexo lipase-água (EQ), sendo a água é liberada (Q) da lipase (E) ao final da reação (LOPRESTO *et al.*, 2014; RANGEL *et al.*, 2022).

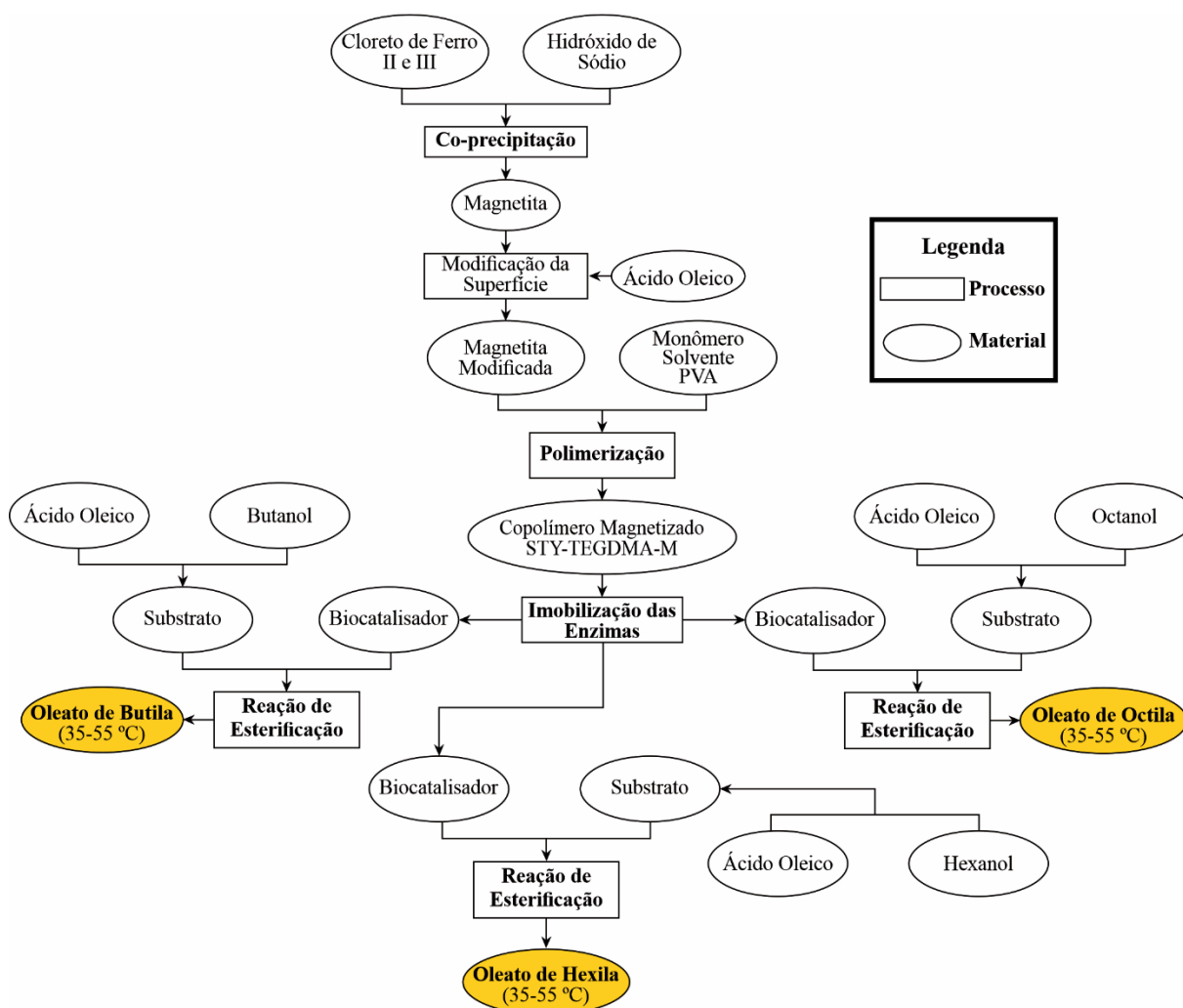
Bhandari et al. (2013), pontuaram diferentes trabalhos nos quais foram aplicados o modelo cinético Ping-Pong Bi-Bi na síntese de diferentes ésteres empregando-se lipases como catalisador. Os autores descreveram que a partir do emprego desse modelo, foi possível obter as taxas para cada condição testada, identificar a existência de inibidores e perceber qual substrato influenciava diretamente no rendimento da reação, demonstrando assim, a importância e utilidade dessa modelagem em bioprocessos.

Trabalho realizado pelo nosso grupo de pesquisa (Silva *et al.*, 2020), resultou em um modelo cinético para síntese enzimática do palmitato de isopropila, com base no mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, empregando a lipase G e a lipase de *Candida rugosa* imobilizadas no suporte poli(estireno-co-divinilbenzeno) como biocatalisadores. Para esta finalidade foram realizados experimentos variando-se a razão molar entre os reagentes (ácido:álcool) e a proporção mássica do biocatalisador. Os autores obtiveram predições satisfatórias por meio de ajustes de curva (R^2 de 0,89 para *Candida rugosa* e R^2 de 0,92 para lipase G) para ambas as lipases, demonstrando que os ajustes dos parâmetros cinéticos foram adequados para o modelo proposto.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e a metodologia utilizada no presente trabalho estão ilustrados a partir de um fluxograma (Figura 5) que demonstra as etapas experimentais e seus respectivos reagentes referentes as etapas do trabalho desenvolvidas em laboratório.

Figura 5 - Fluxograma ilustrativo das principais etapas do trabalho realizado.



*A construção do modelo cinético foi realizada para a condição experimental que apresentou melhor desempenho na síntese do éster emoliente.

Fonte: Próprio autor.

4.1 Materiais

4.1.1 Síntese da Magnetita

O processo de síntese da magnetita foi obtido através dao-precipitação a partir de cloreto de ferro (II) tetra-hidratado (Sigma-Aldrich®, 99%) e cloreto de ferro (III) (Sigma-Aldrich® > 97%) em meio alcalino utilizando hidróxido de sódio (Synth).

4.1.2 Síntese do Suporte

O copolímero magnetizado foi sintetizado a partir da técnica de polimerização em suspensão, na qual a matriz polimérica é constituída de 2 fases, orgânica e aquosa. A fase orgânica é composta de estireno (Sigma-Aldrich®), o agente reticulante dimetacrilato de trietilenoglicol – TEGDMA (Sigma-Aldrich®), o iniciador azobisisobutironitrila – AIBN (MIG Química) e os solventes heptano 95 % (Synth) e toluol (Synth). E a fase aquosa composta por uma solução de álcool polivinílico – PVA 88% hidrolisado – MM 78000 (Polysciences, Inc.) solubilizado em água ultra pura.

4.1.3 Imobilização das Enzimas

Para o processo de imobilização das enzimas, foram utilizados: heptano 95 % (Synth), polietilenoglicol – PEG MM 1500 (Synth) e preparação comercial de Lipase G (*Penicillium camembertii*) e LPP (Lipase Pancreática), adquiridas da Sigma-Aldrich®.

4.1.4 Síntese dos Ésteres

Os ésteres foram sintetizados a partir da uma reação de esterificação utilizando ácido oleico P.S. 99% (Cromoline) e três diferentes álcoois, butanol (Synth), hexanol (Cromoline) e octanol (Synth). E para a quantificação dos ácidos carboxílicos presentes no decorrer da reação foi utilizado hidróxido de potássio (Synth).

4.1.5 Demais Reagentes

Foram utilizados outros reagentes ao longo do trabalho experimental como: acetona (Synth), etanol anidro (Synth), hexanol (Synth), azeite de oliva (Carbonell) e biftalato de potássio P.A. (Synth).

4.2 Equipamentos

A Tabela 3 apresenta os equipamentos utilizados ao longo do trabalho, juntamente com sua aplicabilidade e o fabricante.

Tabela 3 - Equipamentos utilizados durante realização do trabalho.

Equipamento	Análise e/ou ensaio realizado	Modelo/Fabricante
Agitador Magnético	Síntese da magnetita	RW20-Digital, IKA (IKA Laboratory Equipaments)
pHmetro	Medir o pH	TEC2, Tecnal (TECNAL)
Reator de polimerização	Síntese do copolímero magnetizado	P.H.D (RFVCH0.5)
Balança de umidade	Teor de umidade dos biocatalisadores (500mL)	MOC63u – Shimadzu
Balança analítica	Pesagem das massas necessárias Classificação	Shimadzu
Agitador de peneiras	granulométrica dos copolímeros	Sppencer (Série 11-05)
Incubadora com agitação orbital	Imobilização das enzimas e reação de esterificação	MA410 – Marconi
Bomba de vácuo	Filtração dos copolímeros e biocatalisadores	EMF10 - EDWARDS
Espectroscopia de infravermelho (FT-IR)	Caracterização do biocatalisador	PerkinElmerFrontier
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Caracterização do biocatalisador	Tescan MIRA3
Cromatógrafo Gasoso	Quantificação de éster	Nexis GC - 2030 - Shimadzu

Fonte: Próprio autor.

4.3 Metodologia Experimental

4.3.1 Síntese da magnetita por co-precipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+}

Soluções aquosas de FeCl_2 $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ (60 mL) e de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $1,1 \text{ mol L}^{-1}$ (60 mL), foram misturadas de forma branda sob aquecimento e agitação mecânica de 290 rpm. A temperatura do meio reacional foi estabilizada a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e a solução aquosa de NaOH 4 mol L^{-1} foi adicionada lentamente ao meio a fim de atingir pH 11,0. Após atingir a condição citada o meio foi deixado sob agitação por 30 min a $65 \text{ }^\circ\text{C}$ e em seguida deixado em repouso sobre um ímã para auxiliar a decantação das partículas magnéticas do precipitado formado na reação. A massa negra decantada foi separada e lavada com água UP e solução 1:1 de acetato de etila e água UP até atingir pH 7,0. O fluido férrico contendo as partículas magnéticas foi filtrado a vácuo e levado à estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18 h como descrito por Bento et al. (2017).

4.3.2 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico

O precipitado formado após secagem foi misturado sob agitação constante em ácido oleico numa proporção adequada de 1:13 (m/v) de ácido oleico:magnetita. Em seguida foram adicionados 25 mL de água para cada grama de partícula magnética, sendo a mistura mantida sob agitação por 30 min. A emulsão formada foi filtrada a vácuo e lavada com etanol anidro para total remoção de ácido oleico ainda presente. As partículas magnéticas modificadas foram colocadas na estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 18h para completa secagem, para então serem adicionadas à etapa de polimerização (BENTO *et al.*, 2017).

4.3.3 Síntese do copolímero magnetizado à base de estireno

A polimerização foi realizada empregando uma fase orgânica e uma fase aquosa em um reator de polimerização de tanque agitado de 500 mL, de vidro e encamisado. A fase aquosa foi composta por solução de álcool polivinílico (agente de suspensão) e água ultrapura (UP). Nessa mistura, a fase orgânica foi composta pelos monômeros de estireno e o agente reticulante, 1% (m/m) de AIBN como iniciador e 20% (m/m) de magnetita modificada com ácido oleico da massa total da fase monomérica. Também foi empregado toluol como solvente de elevada afinidade e heptano como solvente de baixa afinidade. A copolimerização ocorreu no reator sob

atmosfera inerte de nitrogênio a 70 °C por 6 horas, com agitação mecânica de 310 rpm (Figura 6). Após a polimerização, o meio contendo as partículas de copolímero foi filtrado a vácuo e lavado exaustivamente com água ultrapura (UP) à temperatura ambiente, água UP aquecida a cerca de 70°C e uma mistura de acetona e etanol (1:1) para remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C por 18 h e peneirado para classificação granulométrica.

Figura 6 - Sistema experimental utilizado na síntese dos suportes poliméricos.



Fonte: Próprio autor.

Rosa (2019), em sua dissertação de mestrado realizada no Laboratório de Biocatálise da EEL-USP, encontrou as melhores condições de síntese do suporte polimérico STY-TEGDMA-M, com fase orgânica (50 mL) composta por 30% de monômero e 70% de solvente e fase aquosa (400 mL) composta por 1% (m/v) de PVA em água UP. A Tabela 4 demonstra as proporções de cada componente presente na reação de polimerização.

Tabela 4 - Proporção mássica utilizada na síntese do copolímero magnetizado STY-TEGDMA-M com 30% (m/m) de monômero e 70% (m/m) de solvente.

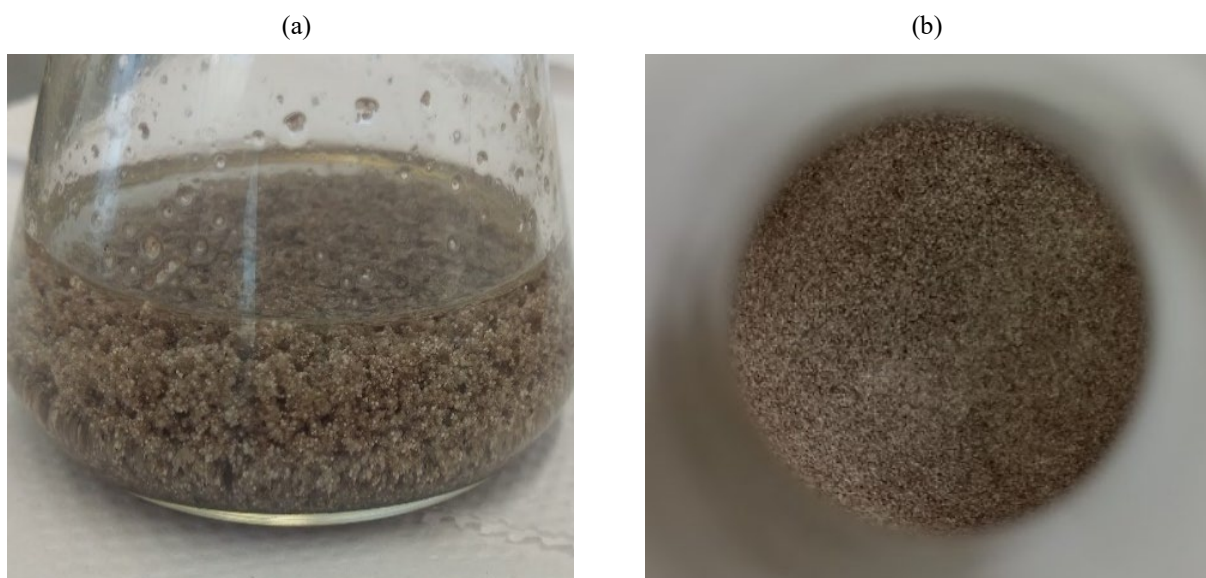
Fase Orgânica	Reagente	Proporção mássica % (m/m)
		STY-TEGDMA-M
Monômero (30%)	Estireno	55
	Reticulante	45
Solvente (70%)	Heptano	50
	Toluol	50

Fonte: Próprio autor.

4.3.4 Imobilização das lipases de *Penicillium camemberti* (Lipase G) e Lipase pancreática (LPP)

A metodologia de imobilização utilizada no presente trabalho foi a de adsorção física. Assim, o suporte magnetizado foi embebido em heptano na proporção 1:10 (m/v) e mantido sob agitação durante 2h. Após este período a lipase utilizada foi adicionada numa razão mássica enzima:suporte de 1:4. Uma solução de 5g L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG-1500) foi preparada e 100µL desta solução foram adicionados para cada grama de suporte presente, como agente estabilizante da enzima. O sistema foi mantido sob agitação branda à temperatura ambiente por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h sob refrigeração de 4 °C. A recuperação do derivado imobilizado foi efetuada por filtração a vácuo, com lavagens constantes com heptano, seguido de secagem à vácuo com sílica e pentóxido de fósforo, até a redução da umidade dos derivados imobilizados (abaixo 10 %).

Figura 7 - Imobilização das lipases no suporte magnetizado: (a) Derivado imobilizado embebido em heptano; (b) Derivado imobilizado após secagem.



Fonte: Próprio autor.

4.3.5 Síntese dos ésteres (oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila) em frasco agitado

Os ésteres emolientes foram sintetizados através da reação de esterificação do ácido oleico com diferentes álcoois: butanol, hexanol e octanol, em meio isento de solvente. As sínteses foram catalisadas pelos biocatalisadores formados pelas lipases G e LPP imobilizadas em STY-TEGDMA-M, formando os derivados denominados de G-STY-TEGDMA-M e LPP-STY-TEGDMA-M.

As reações de esterificação foram realizadas em batelada utilizando frascos de vidro fechado com capacidade de 100 mL, sendo adicionados 20 mL de substrato numa razão equimolar de ácido/álcool (1:1) e 10% (m/v) de biocatalisador. A reação foi conduzida em *shaker* sob agitação constante de 150 rpm e em diferentes temperaturas (35 – 55 °C), durante 48 horas. Alíquotas foram retiradas em tempos pré determinados e tituladas para quantificação do consumo do ácido graxo presente.

4.4 Metodologia de Análise

4.4.1 Teor de umidade

O teor de umidade dos copolímeros e biocatalisadores sintetizados foi determinado utilizando o método termogravimétrico em uma balança de umidade, sendo a análise realizada em 3 minutos a 105°C.

4.4.2 Análise granulométrica

A análise granulométrica foi realizada utilizando um conjunto de peneiras de aço inox com diferentes *mesh tyler* (20, 24, 42, 60 e 80) em um agitador de peneiras eletromagnético, no qual as partículas poliméricas retidas dentro o intervalo (24 – 80) foram conduzidas ao processo de imobilização.

4.4.3 Dosagem da atividade sintética dos biocatalisadores

A atividade catalítica enzimática dos derivados imobilizados foi quantificada pelo método de esterificação para a obtenção do oleato de etila, assim como em trabalho publicado por Pinto, Freire e Pinto (2014). A reação foi realizada sob agitação de 180 rpm e em temperatura ótima para cada enzima estudada, sendo coletadas alíquotas (a cada 10 minutos) de 200 µL a partir do momento inicial da reação até 1 hora. À cada amostra foram adicionados 10 mL de uma solução de álcool padronizado e titulado com uma solução de KOH 0,04 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade do biocatalisador foi definida pela quantidade de enzima necessária para o consumo de 1 µmol de ácido graxo livre por minuto nas condições de ensaio.

4.4.4 Dosagem de atividade hidrolítica dos biocatalisadores

A atividade hidrolítica do imobilizado foi determinada pelo método de emulsão do azeite de oliva como proposto por Soares et al. (1999), empregando tampão fosfato (pH 7,0) e temperatura de 37°C. A atividade do biocatalisador foi determinada pela quantidade de enzima

necessária para a liberação de 1µmol de ácido graxo livre por minuto. As atividades foram expressas por $U \text{ g}^{-1}$, de acordo com a Equação 1.

$$\text{Atividade } (U \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{(V_a - V_b) \cdot [KOH] \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que: V_a é volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL), V_b = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL), $[KOH]$ é a concentração da solução aquosa de KOH utilizada na titulação (mol L^{-1}), t é o tempo da reação em minutos e m é massa seca de biocatalisador (g).

4.4.5 Teste de Tukey

O teste de Tukey foi realizado com a finalidade de comparar estatisticamente os valores de atividades catalíticas obtidos para os biocatalisadores sintetizados. Foi empregado um nível de significância de 95%, na qual foram adotadas as letras A, para representa maior significância e B, para menor significância.

4.4.6 Caracterização dos biocatalisadores sintetizados

Os biocatalisadores sintetizados foram caracterizados morfológicamente utilizando técnicas de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR). Ambas as análises realizadas seguiram metodologia descrita por De Moraes et al. (2021), em que o MEV foi empregado para obtenção de imagens de alta resolução e ampliação e o FT-IR para identificar os grupos funcionais presentes dos materiais, a partir dos valores de absorção de cada grupo funcional com base na absorção de radiação em diferentes frequências (MOHAMED *et al.*, 2017).

4.4.7 Acompanhamento das reações de esterificação

A formação dos ésteres emolientes foi acompanhada através do consumo de ácidos graxos presentes nas reações de esterificação, sendo quantificado por titulação utilizando uma solução aquosa de KOH ($0,04 \text{ mol L}^{-1}$) e fenolftaleína como indicador. Alíquotas foram coletadas e adicionadas a um Erlenmeyer juntamente a 10 mL de álcool etílico padronizado e tal consumo pôde ser acompanhado pela Equação 2 e sua conversão de acordo com a Equação 3.

$$\text{Ácido Carboxílico}(g/L) = \frac{V * M * MM}{v} \quad (\text{Equação 2})$$

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

$$\text{Conversão (\%)} = \frac{(C_i - C_t)}{C_i} * 100 \quad (\text{Equação 3})$$

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

4.4.8 Estabilidade térmica do biocatalisador

O teste da estabilidade térmica da lipase G imobilizada no suporte STY-TEGDMA-M foi realizado a partir da quantificação da sua atividade sintética residual após incubação à 60°C em solvente (heptano) durante 4 horas. Para isso, o derivado imobilizado foi incubado em 4 mL de heptano em erlenmeyers em tempos pré-determinados (30, 60, 120, 180 e 240 min) sob temperatura de 60°C . Posteriormente, os frascos foram resfriados em banho de gelo, sendo quantificada a atividade residual do biocatalisador, em duplicata, na esterificação do oleato de hexila à 45°C , empregando metodologia modificada de Pinto *et al* 2014.

A constante de desativação térmica (K_d) foi obtida a partir da linearização da Equação 4 e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) a partir da Equação 5.

$$\ln A = \ln A_0 - K_d * t \quad (\text{Equação 4})$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{K_d} \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: A é a atividade residual após o período de incubação e realização da atividade catalítica sintética (U g^{-1}), A_0 é a atividade catalítica inicial (U g^{-1}) e t (minuto) é o tempo para realização da atividade catalítica sintética.

4.4.9 Construção do modelo cinético enzimático aplicando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi

O modelo cinético enzimático para a síntese do oleato de hexila em diferentes temperaturas (35 – 55 °C) foi adotado para o presente estudo conforme descrito por Silva et al. (2020), utilizando o software Scilab 6.1. Foram encontrados os melhores ajustes trabalhando-se com os parâmetros de K_m , K' e K_i para cada reagente e produto utilizado e K_{eq} e V_{max} para cada condição operacional aplicando-se o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, em uma reação de esterificação catalisada pela lipase G. A taxa de reação global (r) é apresentada através da Equação 6.

$$r = \frac{V_{max}^f V_{max}^r C_{Ac} C_{Al} - \frac{C_{Es} C_W}{K_{eq}}}{\left[V_{max}^r K_{iAc} K_{mAl} \left(1 + \frac{C_{Al}}{K'_{iAl}} \right) + V_{max}^r K_{mAl} C_{Ac} \left(1 + \frac{C_{Ac}}{K'_{iAc}} \right) + V_{max}^r K_{mAc} C_{Al} \left(1 + \frac{C_{Al}}{K'_{iAl}} \right) + \frac{V_{max}^f K_{mW} C_{Es}}{K_{eq}} + \frac{V_{max}^f K_{mEs} C_W}{K_{eq}} + V_{max}^f C_{Ac} C_{Al} + \frac{V_{max}^f K_{mW} C_{Ac} C_{Es}}{K_{eq} K_{iAc}} + \frac{V_{max}^r C_{Es} C_W}{K_{eq}} + \frac{V_{max}^r K_{mAc} C_{Al} C_W}{K_{iW}} + \frac{V_{max}^r C_{Ac} C_{Al} C_{Es}}{K_{iEs}} + \frac{V_{max}^f C_{Al} C_{Es} C_W}{K_{iAl} K_{eq}} \right]} \quad (\text{Equação 6})$$

Em que: V_{max}^f é a taxa máxima da reação direta, V_{max}^r é a taxa máxima da reação inversa, C_{Ac} é a concentração inicial do ácido, C_{Al} é a concentração inicial do álcool, C_{Es} é a concentração inicial do éster, C_W é a concentração inicial da água, K_{eq} é a constante de equilíbrio, K_{iAc} é a constante de inibição do ácido, K_{mAc} é a constante de Michaelis para o ácido, K_{mAl} é a constante de Michaelis para o álcool, K'_{iAl} é a constante inversa de inibição do álcool, K'_{iAc} é a constante inversa de inibição do ácido, K_{mW} é a constante de Michaelis da água, K_{mEs} é a constante de Michaelis do éster, K_{iW} é a constante de inibição da água e K_{iEs} é a constante da inversa do éster.

Após o encontro do melhor ajuste de parâmetro foram realizados os somatórios dos mínimos quadrados utilizando os critérios de informação de Akaike, assim como descrito por Nogueira et al. (2020). O critério de informação de Akaike tem como objetivo a comparação entre diferentes modelos, sendo aplicado, neste caso, para comparar a modelagem construída e os dados experimentais obtidos. Assim, o ajuste definido foi aquele que apresentou menor critério de informação de Akaike corrigido (AIC_C). As Equações 7 e 8 demonstram como obter esses valores.

$$AIC = N \ln \left(\frac{SSE}{N} \right) + 2K \quad (\text{Equação 7})$$

$$AIC_C = AIC + \frac{2K(K+1)}{N-K-1} \quad (\text{Equação 8})$$

Em que: AIC é o critério de informação de Akaike, AIC_C é o critério de informação de Akaike corrigido, N é o número de dados, K é o número de parâmetros e SSE é a soma dos quadrados dos erros.

4.4.10 Desenvolvimento do método cromatográfico para identificação do éster emoliente formado

Para o desenvolvimento do método cromatográfico, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Shimatzu® - Nexis GC - 2023, sendo inicialmente construídas as curvas de calibração para os reagentes empregados na síntese do oleato de hexila (Figura 1 – Anexo A), que foi selecionado como o produto que apresentou melhor rendimento dentre os bioprocessos testados. Para a obtenção da curva de calibração foram preparadas 4 soluções com diferentes concentrações para o ácido oleico e para o hexanol, sendo utilizado metanol como diluente (Tabela 1 – Anexo A).

O cromatógrafo utilizado possui detector de ionização de chama (FID), operou com uma coluna capilar SH-Rtx-5, sendo utilizado como gás de arraste o N_2 com vazão de $0,61 \text{ mL min}^{-1}$ e fluxos de gases de alimentação de 32 e 200 mL min^{-1} de H_2 e ar sintético, respectivamente.

Foram desenvolvidos 2 métodos de análise: um para quantificar o hexanol e outro para quantificar o ácido oleico e a sua conversão em éster. As temperaturas de injetor e detector foram as mesmas para ambos os métodos, 210 e 290°C , respectivamente. A rampa de análise para o hexanol iniciou-se com 125°C , mantida por 5 minutos, sendo posteriormente elevada numa taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ até atingir 170°C , mantendo-se constante por 1 min. Já para o ácido oleico e o éster formado, a rampa foi iniciada em 200°C , numa razão de $20^\circ\text{C min}^{-1}$ até atingir 280°C , mantendo-se constante por 5 minutos.

As amostras foram preparadas a partir da diluição de $140 \mu\text{L}$ do meio reacional em 10 mL de metanol, coletadas em tempos pré-determinados, sendo injetadas $1 \mu\text{L}$ no cromatógrafo.

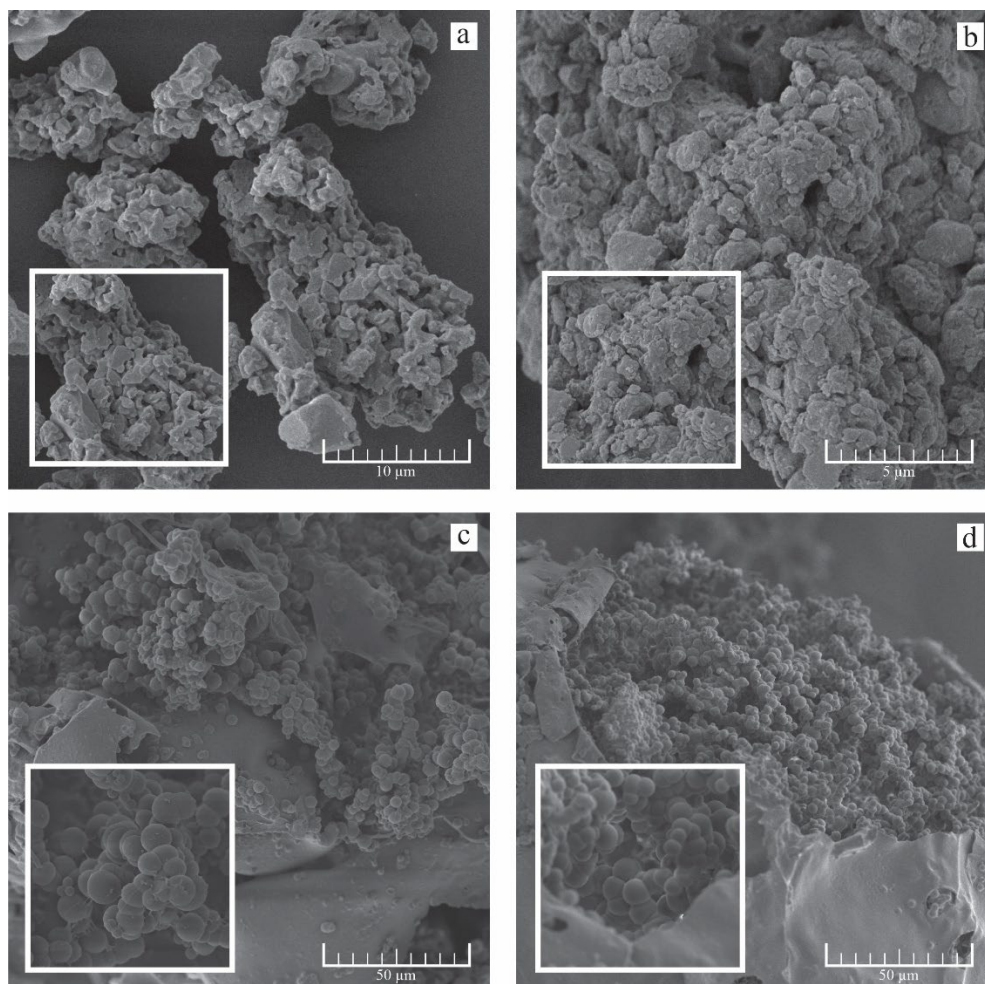
Os cromatogramas referentes à calibração do ácido oleico e do hexanol estão apresentados no Anexo A (Figura 2 – Anexo A). É importante ressaltar que, a formação do éster foi quantificada a partir de cálculos estequiométricos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos biocatalisadores sintetizados

Inicialmente foram realizadas caracterizações morfológicas para os biocatalisadores sintetizados, sendo apresentadas nas Figura 8 e Figura 9, respectivamente, as imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura e os espectros gerados a partir das análises de espectroscopia de infravermelho.

Figura 8 - Micrografias obtidas pelo MEV: (a) Lipase G livre com aumento de 5000 x; (b) Lipase pancreática livre com aumento de 5000 x; (d) G-STY-TEGDMA-M com aumento de 1000 x e (e) LPP-STY-TEGDMA-M com aumento de 1000 x.



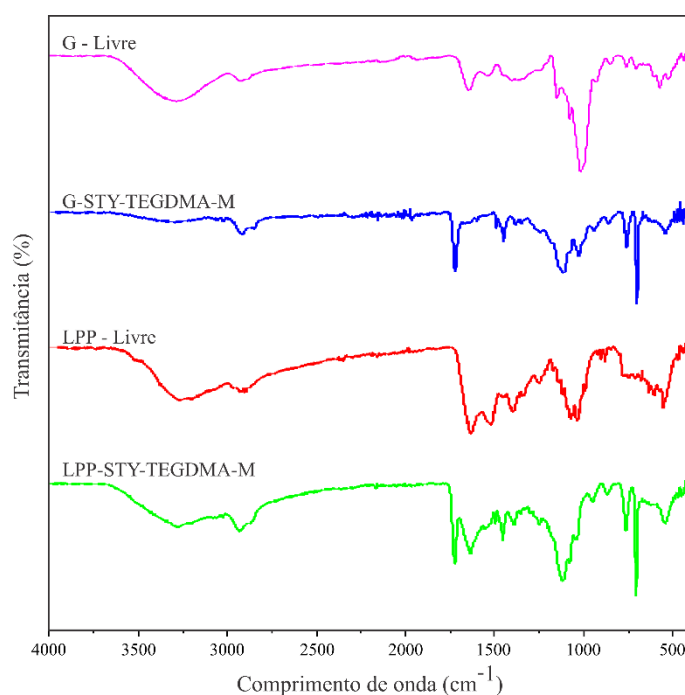
Fonte: próprio autor.

As Figura 8 (a) e 8 (b) apresentam as imagens obtidas das lipases livres (lipase G e pancreática) a fim de identificá-las quando imobilizadas no suporte polimérico, o que pode ser

observado nas Figura 8 (c) e 8 (d). Nota-se a presença de “aglomerados” aderidos à superfície do suporte, constatando que as lipases foram adsorvidas aos copolímeros, durante o processo de imobilização.

Resultados semelhantes obtidos pelas micrografias apresentadas na Figura 8, foram encontrados pelos autores Bento et al. (2017), Dos Santos et al. (2021), Jacob, Wahab e Mahat, (2021) e Xie e Huang (2018), quando empregaram diferentes lipases imobilizadas em diferentes suportes.

Figura 9 - Espectros de FT-IR das lipases livres e dos biocatalisadores sintetizados: Lipase G (magenta), Lipase pancreática (vermelho), G-STY-TEGDMA-M (azul); LPP-STY-TEGDMA-M (verde).



Fonte: Próprio autor.

Na Figura 9 são apresentados os espectros referentes às lipases livres (G e pancreática) e aos biocatalisadores sintetizados (G-STY-TEGDMA-M e LPP-STY-TEGDMA-M). Foi observado as bandas características do suporte polimérico magnetizado assim comodescrito por Rosa (2019). Além disso, é possível notar as bandas características para aos grupos pertencentes as lipases, como a das ligações C-NH-C, em 1060 cm^{-1} , grupos amino nas bandas entre 1650 e 1540 cm^{-1} e na faixa de 1700 cm^{-1} a presença de grupos funcionais relacionadas a carbonila (C=O) (ARSALAN; YOUNUS, 2018; FACIN *et al.*, 2018).

5.2 Atividade enzimática dos biocatalisadores

A quantificação da atividade catalítica das lipases imobilizadas em STY-TEGDMA-M foi realizada tanto em reações de hidrólise como de esterificação (Tabela 5). Ambos os derivados imobilizados apresentaram atividade sintética para a síntese do oleato de etila, sendo que a lipase G demonstrou atividade superior à LPP, o que já era esperado, visto que ela é relatada na literatura como uma lipase com elevada eficiência para catalisar reações de sínteses. Em relação à atividade hidrolítica foi possível mensurar apenas o desempenho da LPP, visto que a lipase G não hidrolisa triacilgliceróis (LIU *et al.*, 2018).

Além disso, foram realizados testes estatísticos para a comprovação dessa melhor atividade catalítica apresentada pelo biocatalisador G-STY-TEGDMA-M nas reações de esterificação do oleato de etila. Para esta finalidade foi empregado o teste de Tukey por meio do *software* Minitab 21, como 95% de confiança, sendo as letras A e B utilizadas para diferenciar os resultados obtidos segundo suas significâncias

Tabela 5 - Atividade catalítica e umidade dos biocatalisadores sintetizados e resultado do teste de Tukey.

Biocatalisador	Atividade de Esterificação (U g ⁻¹)	Atividade Hidrolítica (U g ⁻¹)	Teor de umidade (%)
G-STY-TEGDMA-M	564,63 ^A	-	8,95
LPP-STY-TEGDMA-M	326,32 ^B	1262,53	7,68

Fonte: Próprio autor.

A superioridade em relação a atividade sintética da lipase G, foi comprovada estatisticamente, assim como pode ser observado na Tabela 5, visto que a letra A representa que a diferença entre as atividades observadas foi significativa (item 4.4.5).

Em trabalho realizado por Silva et al. (2020), que empregou um suporte similar ao utilizado no presente estudo, para imobilizar a lipase G, obteve um valor de 119 U g⁻¹ de atividade catalítica na mesma síntese, valor esse, inferior ao encontrado pelo biocatalisador G-STY-TEGDMA-M desenvolvido (564,63 U g⁻¹). Dessa forma, constata-se a eficiência da matriz polimérica utilizada no presente trabalho para imobilizar lipases e aplicá-la na síntese de ésteres.

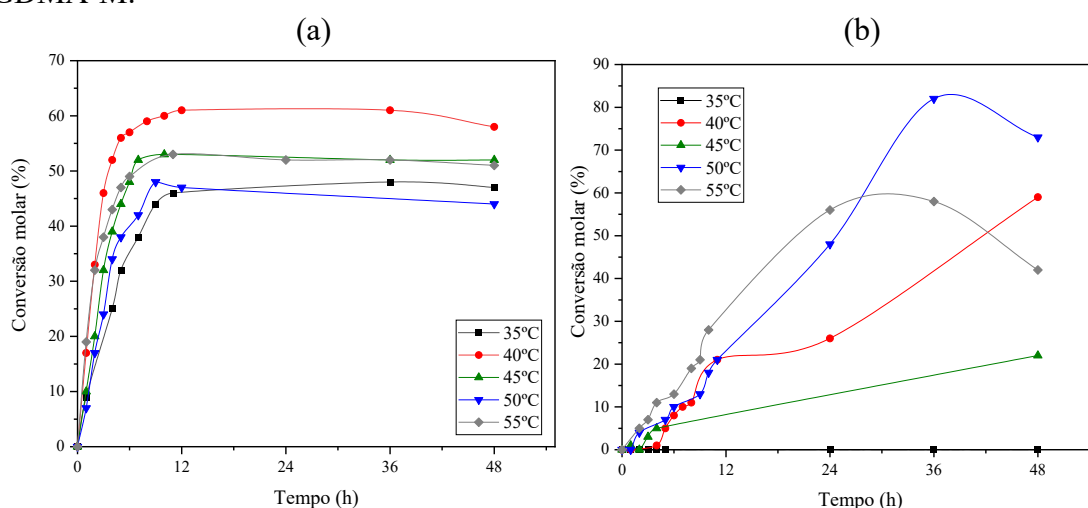
5.3 Influência da temperatura na síntese dos ésteres oleato de butila, oleato de hexila e oleato de octila

A fim de avaliar a influência da temperatura na síntese dos ésteres oleatos de butila, hexila e octila via esterificação do ácido oleico com os respectivos álcoois butanol, hexanol e octanol, em meio isento de solvente, catalisado pela lipase de *Penicillium camembertii* (Lipase G) e a lipase pancreática (LPP) imobilizadas no suporte polimérico STY-TEGDMA-M, foram realizados ensaios empregando diferentes temperaturas na faixa de 35 - 55 °C e razão molar de 1:1. A razão equimolar entre os reagentes foi utilizada, visto que, resultados obtidos anteriormente pelo grupo de pesquisa demonstraram que essa condição promove os melhores rendimentos de esterificação.

5.2.1 Oleato de Butila

As Figura 10 (a) e (b) mostram as conversões obtidas na síntese do oleato de butila empregando os biocatalisadores de G-STY-TEGDMA-M e LPP-STY-TEGDMA-M, respectivamente, sob diferentes temperaturas.

Figura 10 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de butila empregando diferentes biocatalisadores na faixa de temperatura 35-55 °C (10% m/v de biocatalisador e agitação de 150 rpm): (a) G-STY-TEGDMA-M; (b) LPP-STY-TEGDMA-M.



Fonte: Próprio autor.

Observando-se a Figura 10, nota-se que, de modo geral, as reações nas quais a lipase G (Figura 10a) foi empregada, atingiram conversão máxima já em 12h de reação, ou seja, a partir desse tempo a conversão foi mantida estável, variando-se o valor obtido para cada temperatura

testada. Esse fato, no entanto, não foi observado para as sínteses em que foi utilizada a lipase pancreática (Figura 10b) como biocatalisador, o que provavelmente pode estar relacionado ao teor de pureza desta enzima, que de acordo com a literatura, apresenta em sua composição outros compostos, além de lipase, o que justifica o seu baixo custo (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012; VESCOVI; DOS SANTOS; TARDIOLI, 2017)

As conversões máximas obtidas empregando-se a lipase G variaram de 44-61% já nas primeiras 12 h de reação, diferentemente dos resultados obtidos para reações catalisadas pela LPP, que nas primeiras horas de reação apresentaram conversões baixas, atingindo valores mais elevados após 24 h (20-80%). Esses dados mostraram que a lipase G converteu o ácido graxo à éster de forma mais rápida que a LPP.

Em trabalho realizado por Bidjou-Haiour e Klai (2013), em que imobilizaram a lipase pancreática em celite, obtiveram 63% de conversão somente em 72h de reação, demonstrando similaridade ao presente estudo no que se refere ao comportamento dessa lipase. Silva et al. (2014) ao imobilizarem a LPP em PHB obtiveram 93% de conversão sob 40°C após decorridas 12 horas de reação, no entanto foi utilizado solvente no meio reacional, o que gera toxicidade ao bioprocessamento, necessitando de etapas posteriores de purificação do produto.

Em ambas as reações, notou-se que as menores conversões foram obtidas na temperatura de 35°C, o que pode ser explicado em função da menor energia cinética fornecida à essa temperatura, dificultando as colisões entre reagentes/enzima, culminando em uma menor formação de produtos.

Na Figura 10 (a) notou-se que as melhores conversões (50 – 60%) foram obtidas na faixa de temperatura entre 40 – 45°C, próxima à temperatura ótima da lipase G livre, que é 45°C. Com a imobilização esperava-se que a estabilidade do sistema imobilizado fosse ampliada para temperaturas mais elevadas, o que não foi observado nesse caso. Já na Figura 10 (b), a melhor conversão foi obtida à temperatura de 50° C, atingindo cerca de 80%. Esse fato é bastante interessante, visto que a faixa de temperatura ótima da lipase pancreática livre é 35 – 45°C (MENDES; OLIVEIRA; DE CASTRO, 2012), mostrando que a imobilização desta lipase no suporte de STY-TEGDMA-M apresentou um bom desempenho, e que o maior fornecimento de energia cinética contribuiu para a velocidade da reação, formando mais produto.

No entanto, notou-se que com o decorrer da reação (Figura 10a), ou seja, em tempos maiores (36 – 48h), ocorreu um decaimento na conversão dessa síntese nas temperaturas de 50 e 55°C, demonstrando queda na formação do éster. Uma possível hipótese para esta constatação, pode estar relacionada ao aumento da temperatura, que acelera a velocidade de reação e forma produto mais rapidamente, neste caso, éster e água. Como se trata de uma reação reversível, em

um dado momento a reação inversa pode ter sido favorecida, hidrolisando o éster presente no meio reacional, comprovando o decaimento da formação do produto de interesse.

De modo geral, observa-se que as maiores conversões foram obtidas nas sínteses que empregaram a lipase pancreática, o que pode estar relacionado a uma redução da atividade catalítica da lipase G nesse meio reacional, que tem uma polaridade considerável, já que o álcool utilizado, butanol, apresenta apenas 4 carbonos em sua cadeia carbônica, e como é sabido, um meio reacional polar pode remover a camada de hidratação da lipase, e consequentemente, reduzir sua atividade catalítica (SOUSA *et al.*, 2021; ZIENIUK; FABISZEWSKA; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, 2020).

5.2.2 Oleato de Hexila

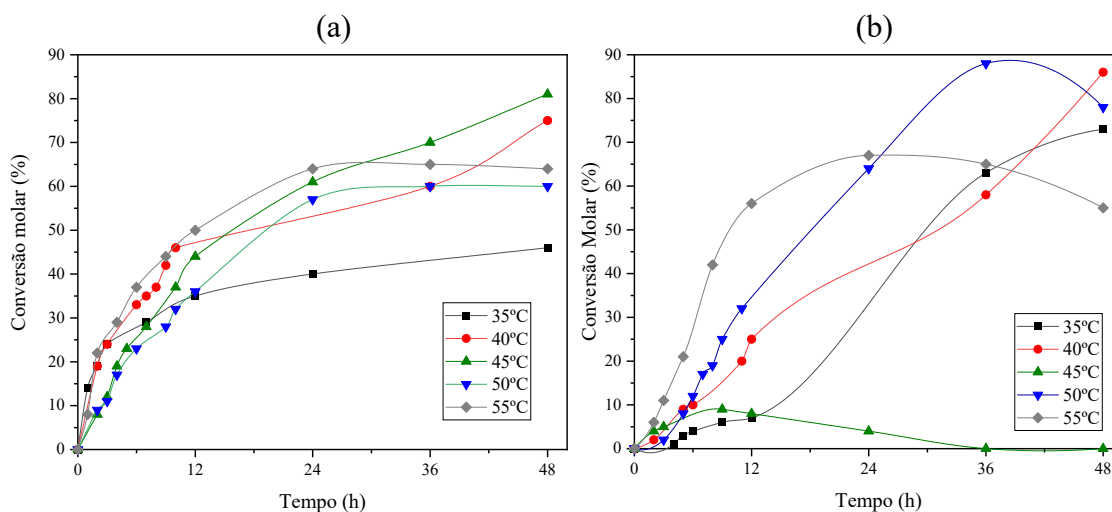
O consumo de ácido graxo presente na reação de esterificação para a obtenção do oleato de hexila foi acompanhado durante 48 horas. A Figura 11 (a) e (b) mostra o desempenho dos biocatalisadores G-STY-TEGDMA-M e LPP-STY-TEGDMA-M, respectivamente, nessa síntese, na faixa de temperaturas de 35 – 55 °C.

Similarmente ao observado para o oleato de butila, na síntese do oleato de hexila empregando-se a lipase G (Figura 11a), observou-se que a maioria das reações tendeu a uma estabilização da conversão já nas primeiras 24h, com exceção das reações conduzidas às temperaturas 40 e 45°C, que provavelmente precisariam de mais tempo para atingir essa condição. Em relação à lipase pancreática (Figura 11b), também não foi alcançada uma estabilização da conversão, assim como observado para o oleato de butila.

Os maiores consumos do ácido oleico foram obtidos em 45° C empregando-se a lipase G, e em 50°C utilizando-se a lipase pancreática, atingindo 81% e 88% de conversão, respectivamente. Analisando a Figura 11(b) também foi notada uma queda na formação do éster em temperaturas mais elevadas a partir de 36h de decorrida a reação, o que também pode estar relacionada com a formação de água na reação, e consequentemente o favorecimento da reação de hidrólise.

Lei et al. (2009) imobilizaram a LPP em microesferas poliméricas magnetizadas para catalisar a síntese do acetato de hexila realizada a 50°C em meio solvente, e obtiveram conversões máximas de 83%, o que demonstra uma elevada eficiência do biocatalisador testado no presente trabalho, visto que, as sínteses realizadas no atual estudo, não empregam solventes.

Figura 11 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de hexila empregando diferentes biocatalisadores na faixa de temperatura 35-55 °C (10% m/v de biocatalisador e agitação de 150 rpm): (a) G-STY-TEGDMA-M; (b) LPP-STY-TEGDMA-M.



Fonte: Próprio autor.

Em geral, as conversões obtidas na síntese do oleato de hexila empregando a lipase G foram superiores às encontradas para o oleato de butila, permitindo constatar um melhor desempenho dessa lipase em meios reacionais menos polares, já que o álcool empregado aqui apresenta 6C em sua cadeia carbônica. Já para a lipase pancreática foi observado um desempenho similar ao obtido para o oleato de butila, demonstrando uma menor influência do tamanho da cadeia carbônica do álcool no desempenho desse biocatalisador.

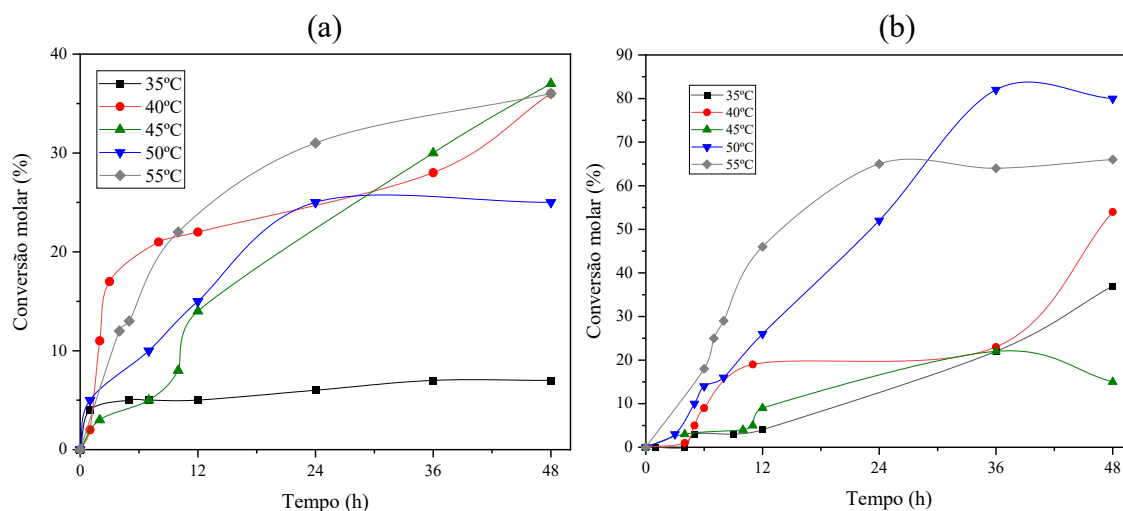
5.2.3 Oleato de Octila

A Figura 12 (a) e (b) mostra os perfis de conversão obtidos em cada temperatura nas reações catalisadas pelas lipases G e LPP imobilizadas no suporte polimérico magnetizado na síntese do éster oleato de octila, empregando as mesmas condições operacionais para a síntese dos ésteres já citados.

A Figura 12 (a) mostra que a maioria das reações não alcançou o equilíbrio no tempo de 48h, necessitando de tempo adicional para que essa condição fosse atingida, diferentemente do que foi observado nas Figura 10 (a) e 11 (a). Adicionalmente, notou-se que a máxima conversão obtida empregando-se a lipase G foi de apenas 37% em 45°C. Esse fato pode estar relacionado à maior viscosidade do meio reacional (11,21 cSt), visto que o álcool empregado

nesta série de reações, o octanol, apresenta 8 C em sua cadeia carbônica, dificultando o contato enzima/substrato e conseqüentemente reduzindo a formação do produto.

Figura 12 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de octila empregando diferentes biocatalisadores na faixa de temperatura 35-55 °C (10% m/v de biocatalisador e agitação de 150 rpm): (a) G-STY-TEGDMA-M; (b) LPP-STY-TEGDMA-M.



Fonte: Próprio autor.

Para as reações que empregaram a lipase pancreática (Figura 12b) foi observado perfil similar aos ésteres de butila e hexila, ou seja, a não ocorrência da conversão máxima ao final das 48h. A máxima porcentagem alcançada na síntese do oleato de octila catalisada por essa lipase foi de 80% em 50°C, mais uma vez, constatando que essa lipase sofre menor influência sobre o tamanho da cadeia carbônica do substrato no seu desempenho catalítico na síntese dos ésteres estudados no presente trabalho.

Em trabalho realizado por Paula et al. (2007), em que estudaram o desempenho da lipase pancreática imobilizada em uma matriz híbrida de polissiloxano-álcool polivinílico em diferentes meios reacionais, visando a síntese de ésteres, puderam concluir que o tipo de álcool utilizado (com diferentes tamanhos da cadeia carbônica), praticamente não influenciou os resultados obtidos. Em outro trabalho realizado Mendes e Castro (2012), que estudaram a especificidade da lipase pancreática em diferentes substratos, foi verificada uma forte influência do tamanho da cadeia carbônica do ácido graxo na síntese do éster, indicando uma preferência dessa lipase para ácidos graxos de C8 a C16. As observações encontradas em ambos os trabalhos, corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, em que a LPP não

apresentou diferenças marcantes em seu desempenho na catálise dos diferentes ésteres sintetizados.

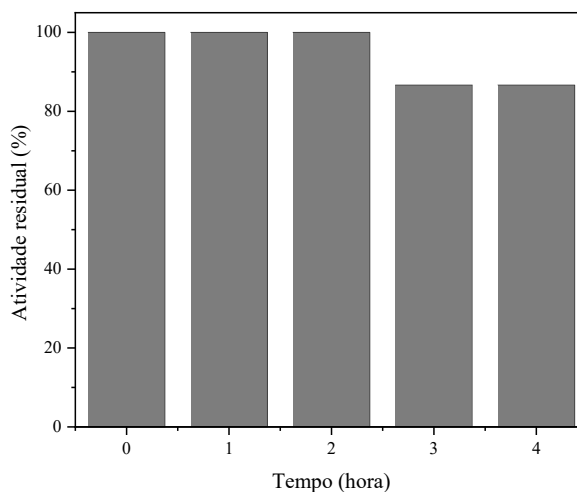
Outra similaridade apresentada pelo biocatalisador LPP-STY-TEGDMA-M, também observada na síntese dos demais ésteres avaliados neste trabalho, é que após 36h de reação, sob temperaturas mais elevadas (50 – 55°C) ocorre uma queda na formação do éster, demonstrando que, sob essas condições, de maior tempo reacional da lipase exposta a temperaturas mais elevadas, pode ocorrer a hidrólise do éster formado.

Dessa forma, para dar continuidade aos estudos no presente trabalho foi selecionado o seguinte bioprocesso: síntese do oleato de hexila empregando-se o biocatalisador G-STY-TEGDMA-M, visto que, foram obtidas elevadas conversões máximas e não ter sido observada nenhuma queda de conversão do éster ao longo das 48h de reação. Além disso, o elevado desempenho da lipase G em reações de esterificação é bastante explorado pela literatura Hermanová et al. (2016), Hude et al. (2016), Mendes et al. (2011), Silva et al. (2020) e Vilas Bôas et al. (2018), corroborando com os dados obtidos no presente trabalho.

5.4 Estabilidade térmica do biocatalisador G-STY-TEGDMA-M

Após a seleção do melhor bioprocesso foi realizado o teste de estabilidade térmica do biocatalisador que empregou a lipase G imobilizada em matriz polimérica magnetizada. A atividade catalítica residual do biocatalisador foi obtida após sua incubação a 60°C em solvente (heptano) durante 4 horas, por meio da determinação da sua atividade sintética. A Figura 13 apresenta a atividade residual do derivado imobilizado.

Figura 13 - Atividade residual da lipase G imobilizada em STY-TEGDMA-M quando exposta a 60°C.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se na Figura 13 a manutenção da atividade do biocatalisador durante as 2 primeiras horas de incubação. Após 4h de incubação a 60°C, constatou-se retenção de 87% da atividade inicial do biocatalisador.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva et al. (2018), que verificaram a estabilidade térmica das lipases de *Burkholderia cepacia* e *Pseudomonas fluorescens* imobilizadas por adsorção física em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, encontrando atividades residuais de cerca de 85% após 3h de incubação a 60°C.

Em outro trabalho realizado, Bento et al. (2017), em que imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* por adsorção física no mesmo suporte que Silva et al. (2018) constataram atividade residual de 70% após 3h de incubação a 60°C e constante de desativação térmica de 0,07 h⁻¹.

Esses dados indicam a elevada eficiência do STY-TEGDMA-M desenvolvido, visto que apresentou atividade residual mais elevada que os trabalhos citados aqui, após 4h de incubação, e que utilizaram suportes semelhantes ao presente estudo. É válido destacar também que a imobilização conferiu à lipase G maior estabilidade térmica, afinal, essa enzima em seu estado livre, apresenta temperatura ótima de 45°C.

Ressalta-se que o copolímero STY-TEGDMA-M vem sendo sintetizado pelo grupo de pesquisa de Biotecnologia da EEL-USP para utilização como suporte de imobilização de lipases, sendo esta aplicação muito pouco explorada na literatura, o que confere ao presente estudo uma maior relevância no que tange à busca por novas matrizes de insolubilização de enzimas. Este

fato também dificulta a comparação com dados da literatura referentes a aplicação desse suporte na área de biocatálise.

5.5 Construção do modelo cinético aplicando mecanismo Ping-Pong Bi-Bi

A partir dos testes realizados empregando os dois biocatalisadores para a síntese de diferentes ésteres emolientes sob temperaturas distintas, foi possível selecionar a melhor condição para o bioprocessamento proposto. Assim, a síntese do oleato de hexila empregando o biocatalisador G-STY-TEGDMA-M foi selecionada para o desenvolvimento da modelagem cinética empregando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.

A Tabela 6 apresenta os parâmetros de K_m , K_i e K'_i descrito em trabalho publicado por Silva et al. (2020), em que utilizaram a lipase G imobilizada poli(estireno-co-divinilbenzeno) para catalisar a síntese do éster palmitato de isopropila, sendo os mesmos adotados no presente estudo para a construção da modelagem proposta.

Tabela 6 - Melhores ajustes de parâmetros obtidos por Silva et al. (2020) na construção do modelo cinético.

Parâmetros	Constantes cinéticas (mol L ⁻¹)
K_{mAc} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para o ácido)	$5,54 \times 10^{-2}$
K_{mAl} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para o álcool)	$4,41 \times 10^{-2}$
K_{mEs} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para o éster)	$1,33 \times 10^{-3}$
K_{mW} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para a água)	$8,23 \times 10^{-2}$
K_{iAc} (constante de inibição do ácido)	$3,84 \times 10^{-3}$
K_{iAl} (constante de inibição do álcool)	5,71
K_{iEs} (constante de inibição do éster)	$1,19 \times 10^{-1}$
K_{iW} (constante de inibição da água)	$7,26 \times 10^1$
K'_{iAc} (constante de inibição inversa do ácido)	$9,50 \times 10^{-1}$
K'_{iAl} (constante de inibição inversa do álcool)	$1,03 \times 10^2$

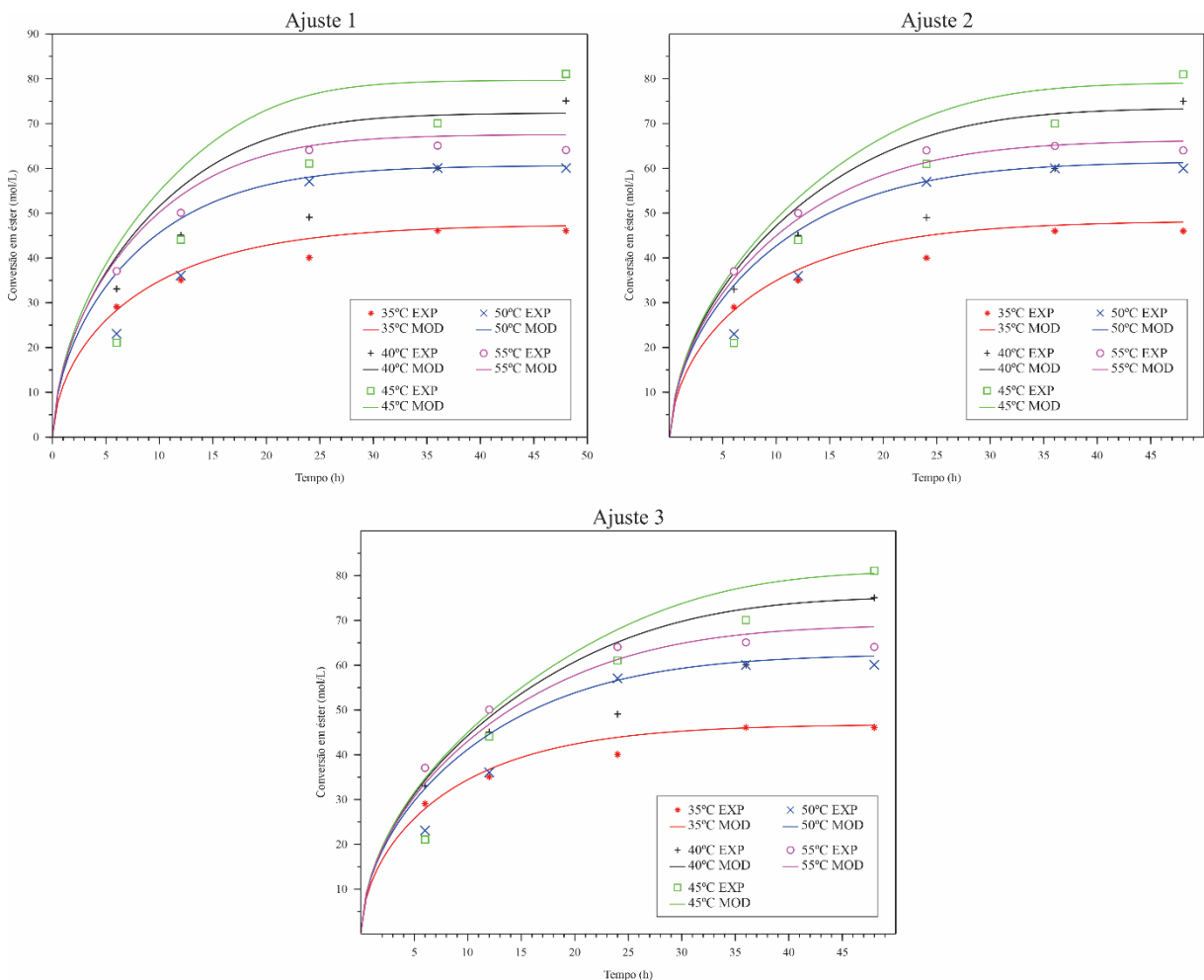
Fonte: Adaptado de Silva et al. (2020).

A partir dos parâmetros apresentados na Tabela 6, pode-se obter diferentes arranjos empregando-se esses parâmetros. As taxas máximas da reação direta e inversa (V_{max}^f e V_{max}^r) foram obtidas a partir da equação da taxa de reação global (r), empregando o mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi e as demais constantes obtidas a partir da Equação de *Arrhenius*. Os valores

referentes as energias de ativação direta e inversa (E_{Ad} e E_{Ai}) das reações também foram ajustados. A Figura 14 apresenta três diferentes perfis obtidos para os dados experimentais e os modelos construídos.

A Figura 14 apresenta três diferentes perfis obtidos para os dados experimentais e a modelagem construída.

Figura 14 - Resultados obtidos para a síntese do oleato de hexila empregando G-STY-TEGDMA-M como catalisador para a faixa de temperatura (35 - 55°C). Dados obtidos experimentalmente: (•) EXP e para o Ajuste obtido pelo modelo (—) MOD.



Fonte: Próprio autor.

A Figura 14 mostra os diferentes ajustes obtidos para a construção do modelo proposto, sendo cada ajuste obtido a partir de uma combinação de dados fixos para cada temperatura, para posterior obtenção dos demais parâmetros estudados. A Tabela 7 apresenta os valores

correspondentes aos critérios de Akaike corrigidos (AIC_C) obtidos através do somatório dos quadrados dos resíduos.

Tabela 7 - Valores do critério de Akaike corrigido (AIC_C) para os diferentes ajustes encontrados para a síntese do oleato de hexila empregando como biocatalisador G-STY-TEGDMA-M.

Ajuste	AIC_C
1	128,8745
2	124,7762
3	125,7457

Fonte: Próprio autor.

Dentre as combinações de parâmetros obtidos, o Ajuste 2 apresentou um valor do critério de Akaike corrigido (AIC_C) inferior aos demais, sendo de 124,7762. Porém, esse valor ainda é elevado quando considerado que a melhor combinação apresentaria valor perto de zero.

Uma possível justificativa para esse valor fora do esperado, é que não foram considerados fatores como transferência de massa e equilíbrio de fases no modelo matemático construído, sendo empregados somente parâmetros cinéticos. Sabe-se que a o deslocamento dos reagentes durante a reação está relacionado à transferência de massa, podendo ocorrer limitações de difusão no interior do suporte, dificultando o acesso aos sítios ativos do biocatalisador. Já o equilíbrio de fases considera variáveis termodinâmicas presentes no meio reacional, nesse caso, ácido graxo e álcool como reagentes e éster e água como produtos formados (ROCHA, 2014; GE; PETERS, 2023; SOUSA et al., 2021). Dessa forma, a ausência desses fatores no modelo construído pode ter impactado diretamente no somatório dos resíduos e AIC_C encontrado.

Ao analisar as constantes de equilíbrio (K_{eq}), para o melhor ajuste foram encontrados valores entre 0,87 e 14,57, e para as energias de ativação direta e inversa, valores de $1,21 \times 10^2$ e $1,34 \times 10^2$ KJ mol⁻¹. Já ao observar as taxas de velocidade das reações diretas, notou-se uma mínima influência da temperatura reacional, encontrando-se valores na faixa de 0,088 a 0,090 mol L⁻¹ min⁻¹, e para a velocidade inversa não foi observada nenhuma alteração, mantendo-se o valor de 0,021 mol L⁻¹ min⁻¹. Esses resultados indicam que a temperatura em que as sínteses foram conduzidas não interferiu cineticamente na ação catalítica da lipase, mesmo ocorrendo a redução da viscosidade em função da elevação da temperatura.

Silva *et al.* (2020), em estudo publicado em que empregaram a lipase G imobilizada poli(estireno-co-divinilbenzeno) para catalisar a síntese do éster palmitato de isopropila,

obtiveram K_{eq} de 11,1, valor esse coerente aos encontrados para o presente estudo, ou seja, dentro da faixa dos valores obtidos. Vale destacar que os autores alcançaram taxas máximas de velocidade inferiores às encontradas aqui, o que demonstra que o bioprocessamento realizado no presente trabalho consome de forma mais rápida os reagentes, e conseqüentemente, forma produto com velocidade mais elevada.

Em estudo realizado por Sousa et al. (2021), os autores descrevem que a cinética reacional é dependente do suporte empregado na imobilização da enzima, da razão molar entre os substratos, da concentração de biocatalisador empregado na síntese e da temperatura reacional. Dessa forma, relatam que, a otimização desses fatores proporcionará um melhor entendimento cinético do bioprocessamento, possibilitando encontrar o ajuste mais adequado para a modelagem matemática.

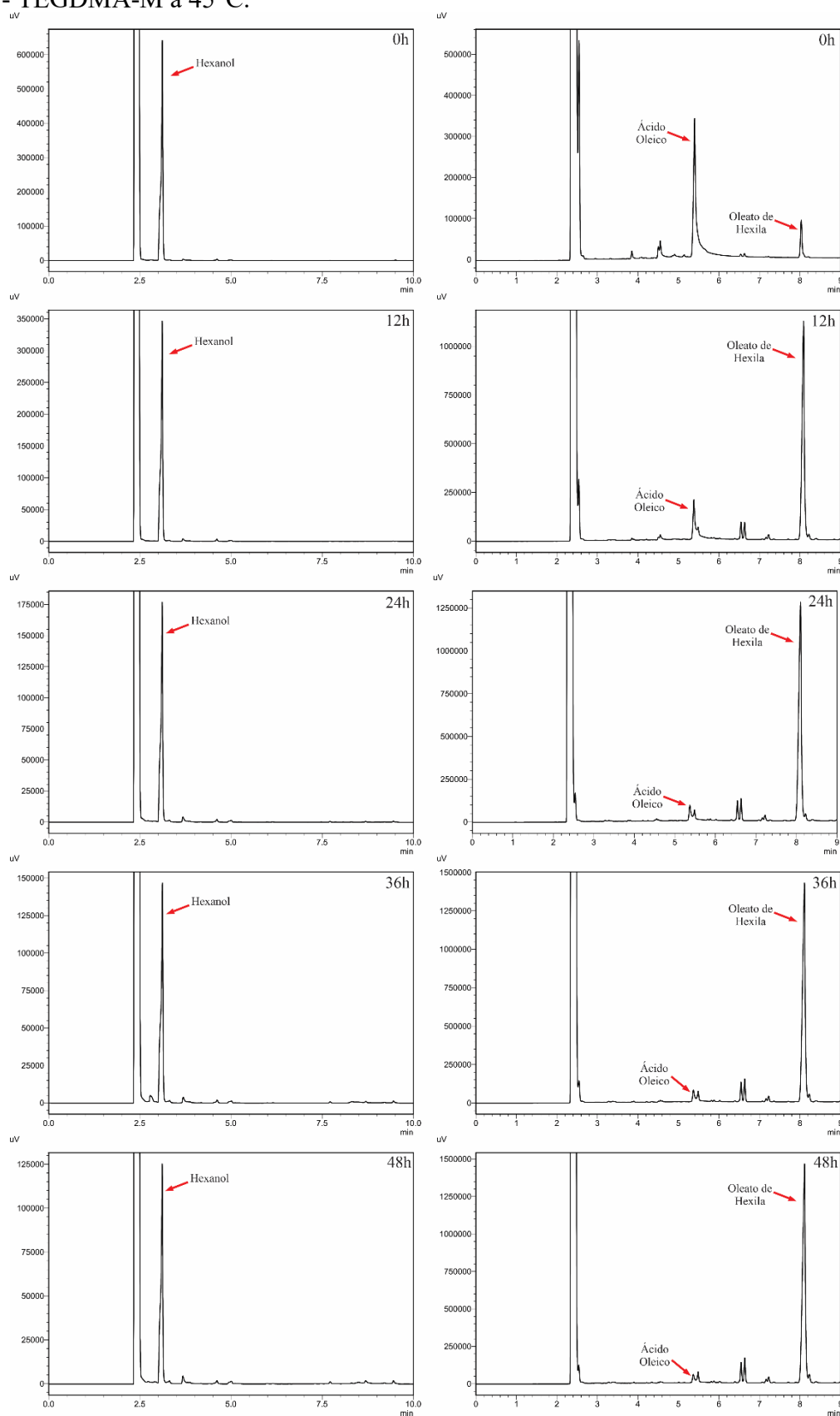
Apesar do mecanismo Ping-Pong Bi-Bi ser muito relatado na literatura, a forma na qual o modelo foi construído no presente trabalho, em que foi levado em consideração as diferentes temperaturas das sínteses, é muito pouco explorada. Além disso, estudos que abordam a síntese do éster oleato de hexila obtido por esterificação enzimática em meio isento de solvente, também é escasso. Essas questões, somadas às citadas anteriormente no item 5.4, implicam em uma dificuldade em realizar comparações com a literatura, constatando a relevância do atual trabalho.

5.6 Análise comprobatória da formação do éster oleato de hexila por cromatografia gasosa

Visando verificar a real formação do éster oleato de hexila, com o intuito de comprovar a idealidade do modelo matemático proposto para este bioprocessamento, foi realizada uma nova síntese do éster emoliente nas melhores condições já selecionadas (45°C). Em tempos pré-determinados foram coletadas amostras e analisadas no método previamente desenvolvido em cromatógrafo gasoso.

A Figura 15 apresenta os cromatogramas referentes ao consumo do hexanol e do ácido oleico e formação do éster durante as 48h de reação. A Tabela 7 apresenta os resultados encontrados.

Figura 15 - Cromatogramas obtidos da síntese do oleato de hexila empregando o biocatalisador G-STY- TEGDMA-M a 45°C.



Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 - Formação do oleato de hexila obtido a partir do consumo do ácido oleico via cromatografia gasosa

Tempo (h)	Formação do éster (%)
0	0
12	56
24	78
36	81
48	84

Fonte: Próprio autor.

Destaca-se que a formação do éster foi obtida a partir da estequiometria do consumo do ácido graxo do meio reacional, visto que, não foi utilizado o padrão do oleato de hexila para a calibração do método cromatográfico.

Os resultados obtidos nos cromatogramas da Figura 15 e na Tabela 7 comprovam a formação do éster emoliente de oleato de hexila, formado na reação de esterificação do ácido oleico e hexanol, em meio isento de solvente, empregando o biocatalisador obtido experimentalmente pela imobilização por adsorção física da lipase G no copolímero de STY-TEGDMA-M, conduzida em modo descontínuo a 45°C.

6 CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos pelo estudo realizado é notável que os biocatalisadores desenvolvidos a partir da imobilização das lipases G e LPP no suporte de poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol) magnetizado com íons férricos foram aptos para sintetizar os diferentes ésteres emolientes em meio isento de solvente. Foram realizadas caracterizações morfológicas dos biocatalisadores, além de quantificações das suas atividades enzimáticas e estabilidade térmica, demonstrando elevada adequação dos sistemas imobilizados obtidos para a aplicação no bioprocessamento de interesse.

Em relação à influência da temperatura nas reações avaliadas, visando-se obter a condição mais adequada para a síntese de éster emoliente, foi possível concluir que:

- A síntese do oleato de butila apresentou conversões máximas empregando-se a lipase G já nas 12 primeiras, atingindo valores que variam de 44 – 61%. Já para as reações catalisadas pela LPP, as maiores conversões só foram encontradas após 24h de reação (20 – 80%);
- Nas sínteses do oleato de hexila foram obtidas conversões de 81% e 88%, respectivamente quando se empregou a lipase G sob 45° C e a lipase pancreática a 50°C;
- Para a obtenção do oleato de octila, as conversões máximas para as sínteses que empregaram a lipase G foi de 37% e 80% para LPP.

Os resultados demonstram que a lipase G sofreu maior influência do tamanho da cadeia carbônica do álcool no seu desempenho durante as sínteses, diferentemente da lipase pancreática, que apresentou conversões máximas similares entre os diferentes ésteres.

O teste de estabilidade térmica realizado para o biocatalisador G-STY-TEGDMA-M apresentou retenção de 87% da sua atividade inicial, após 4h incubado a 60°C, evidenciando que a imobilização conferiu a lipase G maior estabilidade térmica, quando comparada a sua forma livre.

A construção do modelo cinético obtido a partir do mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi foi realizada para o bioprocessamento que sintetizou o oleato de hexila empregando o biocatalisador G-

STY-TEGDMA-M. O melhor ajuste de parâmetros apresentou valor de critério de Akaike corrigido (AIC_C) de 124,7762, o que pode ser justificado pela não inclusão de parâmetros de transferência de massa e equilíbrio de fases no modelo matemático construído.

O desenvolvimento do método de análise por cromatografia gasosa permitiu confirmar a formação do éster emoliente oleato de hexila.

É de suma importância destacar a relevância do trabalho realizado, visto que, o copolímero sintetizado e utilizado para a imobilização das lipases, as sínteses dos ésteres avaliados e a abordagem que foi utilizada para a construção do modelo cinético, na qual considerou a variação da temperatura reacional, são muito pouco exploradas na literatura, e como demonstrado, possuem elevado potencial para uma possível implementação industrial.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Com base nos resultados das sínteses dos ésteres emolientes catalisadas por lipases imobilizadas em copolímero magnetizado e construção da modelagem cinética, foi possível considerar novas e diferentes abordagens para o aperfeiçoamento e potencialização do bioprocessamento. Dessa forma, propõe-se:

- Abordar diferentes métodos de imobilização enzimática, como por exemplo, o método por ligação covalente, visando elevar o desempenho dos biocatalisadores;
- Testar diferentes velocidades de agitação do meio reacional e assim, estudar a influência desse parâmetro na síntese dos ésteres emolientes;
- Avaliar a construção do modelo cinético enzimático a partir do mecanismo Ping-Pong Bi-Bi empregando diferentes temperaturas, razões molares e proporções mássicas de biocatalisador na síntese dos diferentes ésteres emolientes avaliados no presente estudo;
- Incluir no modelo matemático parâmetros de transferência de massa e equilíbrio de fases do bioprocessamento;
- Estudar as reações de esterificação aqui abordadas em outras configurações de biorreatores e modo de operação do bioprocessamento, como por exemplo, reator de leito fixo e fluidizado conduzidos de forma contínua.

REFERÊNCIAS

- ABDELRAHEEM, E. M. M.; BUSCH, H.; HANEFELD, U.; TONIN, F. Biocatalysis explained: from pharmaceutical to bulk chemical production. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 4, n. 11, p. 1878-1894, 2019.
- ABHILASH, M.; THOMAS, D. Biopolymers for Biocomposites and Chemical Sensor Applications. **Biopolymer Composites in Electronics**, v. 1, p. 405–435, 2017.
- ANTHONY, J. Modelling and operation of reactors for enzymatic biodiesel production. 2014. Thesis (Doctor of Philosophy) – Specialty Chemical Engineering of the Technical University of Denmark, Denmark, 2014.
- ARSALAN, A.; YOUNUS, H. Enzymes and nanoparticles: Modulation of enzymatic activity via nanoparticles **International journal of biological macromolecules**, v. 118, p. 1833-1847, 2018.
- BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 503-529, 2017.
- BENÍTEZ-MATEOS, A. I.; CONTENTE, M. L.; ROURA PADROSA, D.; PARADISI, F. Flow biocatalysis 101: design, development and applications. **Reaction chemistry & engineering**, v. 6, n. 4, p. 599-611, 2021.
- BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F.; DE OLIVEIRA, P. C.; FREITAS, L. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 426, p. 95–101, 2017.
- BHANDARI, K.; CHAURASIA, S. P.; DALAI, A. K.; GUPTA, A.; SINGH, K. Kinetic study on enzymatic esterification of tuna fish oil fatty acids with butanol. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 94, p. 104–110, 2013.
- BIDJOU-HAIOUR, C.; KLAI, N. Lipase catalyzed synthesis of fatty acid xylose esters and their surfactant properties. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 4347–4350, 2013.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; ZHAO, Y.; IQBAL, H. M. N.; CUI, J. “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. **International journal of biological macromolecules**, v. 119, p. 278-290, 2018.
- BINHAYEEDING, N.; YUNU, T.; PICHID, N.; KLOMKLAO, S.; SANGKHARAK, K. Immobilisation of *Candida rugosa* lipase on polyhydroxybutyrate via a combination of adsorption and cross-linking agents to enhance acylglycerol production. **Process Biochemistry**, v. 95, p. 174–185, 2020.
- BLÖBAUM, L.; HARINGA, C.; GRÜNBERGER, A. Microbial lifelines in bioprocesses: From concept to application. **Biotechnology Advances**, v. 62, n. 108071, p. 1-14, 2022.
- CHEN, T. L.; KIM, H.; PAN, S. Y.; TSENG, P. C.; LIN, Y. P.; CHIANG, P. C. Implementation of green chemistry principles in circular economy system towards sustainable development goals: Challenges and perspectives. **Science of the Total Environment**, v. 716, p. 136998, 2020.

CORTEZ, D. V.; REIS, C.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. The Realm of Lipases in Biodiesel Production. **Sustainable Biotechnology- Enzymatic Resources of Renewable Energy**. Springer International Publishing, v. 1, p. 247–288, 2018.

DA SILVA, M. V. C.; RANGEL, A. B. S.; DUTRA, F. P.; DE CASTRO, H. F.; DE FREITAS, L. Kinetic and Thermodynamic Study of 2-Ethylhexyl Oleate Synthesis Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase Immobilized on a Magnetic Hybrid Support. **Catalysis Letters**, v. 151, n. 5, p. 1239–1247, 2021.

DA SILVA, M. V. C.; SOUZA, A. B.; DE CASTRO, H. F.; AGUIAR, L. G.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE FREITAS, L. Synthesis of 2-ethylhexyl oleate catalyzed by *Candida antarctica* lipase immobilized on a magnetic polymer support in continuous flow. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 615–623, 2020.

DE LIMA, R.; BENTO, H. B. S.; REIS, C. E. R.; BÔAS, R. N. V.; DE FREITAS, L.; CARVALHO, A. K. F.; DE CASTRO, H. F. Biolubricant Production from Stearic Acid and Residual Secondary Alcohols: System and Reaction Design for Lipase-Catalyzed Batch and Continuous Processes. **Catalysis Letters**, v. 152, n. 2, p. 547–558, 2022.

DE MORAES, N. P.; GOES, C. M.; SPERANDIO, D. C.; ROCHA, R. da S.; LANDERS, R.; PARAMASIVAM, T.; RODRIGUES, L. A. Development of a new zinc oxide/tin oxide/carbon xerogel photocatalyst for visible light photodegradation of 4-chlorophenol. **Materials Science and Engineering B: Solid-State Materials for Advanced Technology**, v. 269, p. 115183, 2021.

DOS SANTOS, M. M. O.; GAMA, R. S.; DE CARVALHO TAVARES, I. M.; SANTOS, P. H.; GONÇALVES, M. S.; DE CARVALHO, M. S.; DE BARROS VILAS BOAS, E. V.; DE OLIVEIRA, J. R.; MENDES, A. A.; FRANCO, M. Application of lipase immobilized on a hydrophobic support for the synthesis of aromatic esters. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 68, n. 3, p. 538–546, 2021.

DUPRAT-DE-PAULE, S.; GUILBOT, J.; ROSO, A.; CAMBOS, S.; PIERRE, A. Augmented bio-based lipids for cosmetics. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 25, n. 5, p. D503, 2018.

DUTRA, L. da S.; COSTA CERQUEIRA PINTO, M.; CIPOLATTI, E. P.; AGUIEIRAS, E. C. G.; MANOEL, E. A.; GRECO-DUARTE, J.; GUIMARÃES FREIRE, D. M.; PINTO, J. C. How the biodiesel from immobilized enzymes production is going on: An advanced bibliometric evaluation of global research **Renewable and Sustainable Energy Reviews** v. 153, p. 111765, 2022.

ESTEROL 145 - Butyl Oleate (High Acid). 2023. Disponível em: http://www.vicchem.com/product_detail?pn=14800. Acesso em: 28 fev. 2023.

FACIN, B. R.; MELCHORS, M. S.; VALÉRIO, A.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. De. Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 58, n. 14, p. 5358-5378, 2019.

FACIN, B. R.; VALÉRIO, A.; BRESOLIN, D.; CENTENARO, G.; DE OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. Improving reuse cycles of *Thermomyces lanuginosus* lipase (NS-40116) by immobilization in flexible polyurethane. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 5, p. 372–380, 2018.

FANTKE, P.; CINQUEMANI, C.; YASENEVA, P.; DE MELLO, J.; SCHWABE, H.; EBELING, B.; LAPKIN, A. A. Transition to sustainable chemistry through digitalization. **Chem**, v. 7, n. 11, p. 2866-2882, 2021.

FURLANI, I. L.; AMARAL, B. S.; OLIVEIRA, R. V.; CASSA, Q. B. Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis. **Quimica Nova**, v. 43, n. 4, p. 463-473, 2020.

GE, J.; PETERS, B. Mass transfer in catalytic depolymerization: External effectiveness factors and serendipitous processivity in stagnant and stirred melts. **Chemical Engineering Journal**, v. 466, p. 143251, 2023.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Screening and production of lipase from fungal organisms. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, v. 14, p. 241-253, 2018a.

GEOFFRY, K.; ACHUR, R. N. Optimization of novel halophilic lipase production by *Fusarium solani* strain NFCCL 4084 using palm oil mill effluent. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 327-334, 2018b.

GOUSSARD, V.; AUBRY, J. M.; NARDELLO-RATAJ, V. Bio-based alternatives to volatile silicones: Relationships between chemical structure, physicochemical properties and functional performances. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 304, p. 102679, 2022.

GRIGORAS, A. G. Catalase immobilization—A review. **Biochemical Engineering Journal**, v. 117, p. 1-20, 2017.

GUIMARÃES, J. R.; DE LIMA CAMARGO GIORDANO, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TARDIOLI, P. W. Evaluation of strategies to produce highly porous cross-linked aggregates of porcine pancreas lipase with magnetic properties. **Molecules**, v. 23, n. 11, p. 2993, 2018.

GUPTA, S.; MAZUMDER, P. B.; SCOTT, D.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasound-assisted production of biodiesel using engineered methanol tolerant *Proteus vulgaris* lipase immobilized on functionalized polysulfone beads. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 68, p. 105211, 2020.

GUTIÉRREZ-FERNÁNDEZ, I.; BENDOU, O.; BUENO-RAMOS, N.; MARCOS-BARBERO, E. L.; MORCUENDE, R.; ARELLANO, J. B. One-Step Suicide Substrate Inactivation Kinetics of a Ping-Pong Reaction with One Substrate Undergoing Disproportionation: A Theoretical Approach with Approximate Solutions. **Mathematics**, v. 10, n. 22, p. 4240, 2022.

HERMANOVÁ, S.; ZAREVÚCKÁ, M.; BOUŠA, D.; MIKULICS, M.; SOFER, Z. Lipase enzymes on graphene oxide support for high-efficiency biocatalysis. **Applied Materials Today**, v. 5, p. 200-208, 1 dez. 2016.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. Biolubricant production from castor oil in a magnetically stabilized fluidized bed reactor using lipase immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 544-556, 2016.

HUDE, M. P.; KOZINSKI, J.; DALAI, A. K.; YADAV, G. D. Novelty of *penicillium camembertii* lipase supported on glutaraldehyde activated-SBA-15 mesoporous silica for

mono-esterification of bioglycerol in non-aqueous media. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 14, n. 4, p. 919–928, 2016.

ISMAIL, A. R.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1624-1639, 2020.

JACOB, A. G.; WAHAB, R. A.; MAHAT, N. A. Ternary biogenic silica/magnetite/graphene oxide composite for the hyperactivation of *Candida rugosa* lipase in the esterification production of ethyl valerate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 148, p. 109807, 2021.

KHAN, F. I.; LAN, D.; DURRANI, R.; HUAN, W.; ZHAO, Z.; WANG, Y. The lid domain in lipases: Structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, p. 16, 2017.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, n. 11, p. 1793-1806, 2015.

KIRDI, R.; BEN AKACHA, N.; 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.

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. 56–67, 2016.

LEI, L.; BAI, Y.; LI, Y.; YI, L.; YANG, Y.; XIA, C. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 4, p. 252–258, 2009.

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, n. 7, p. 991–1002, 2018.

LIU, X.; KOKARE, C. Microbial enzymes of use in industry. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. [s.l.]: Academic Press, 2023. p. 405-444

LIU, Y.; YUAN, D.; ZHAO, Z.; LAN, D.; YANG, B.; WANG, Y. A novel strategy to improve the thermostability of *Penicillium camembertii* mono- and di-acylglycerol lipase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 500, n. 3, p. 639–644, 2018.

LOPRESTO, C. G.; CALABRÒ, V.; WOODLEY, J. M.; TUFVESSON, P. Kinetic study on the enzymatic esterification of octanoic acid and hexanol by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 110, p. 64–71, 2014.

LOVELL, P. A.; SCHORK, F. J. Fundamentals of Emulsion Polymerization. **Biomacromolecules**, v. 21, n. 11, p. 4396-4441, 2020.

LÚCIA CARDOSO, C. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Química Nova**, v. 32, p. 175-187, 2009.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; TOVAR-CASTRO, L.; GARCÍA, H. S.; SAUCEDO-CASTAÑEDA, G.; FAVELA-TORRES, E. Continuous ethyl oleate synthesis by lipases produced by solid-state fermentation by *Rhizopus microsporus*. **Bioresource Technology**, v. 265, p. 52–58, 2018.

MCDONALD, A. **The Enzyme List Class 3-Hydrolases Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) L A T E X version prepared by.** [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html>. Acesso em: 22 abr. 2023.

MCDONALD, A. G.; TIPTON, K. F. **Enzyme nomenclature and classification: the state of the art** **FEBS Journal**, v. 290, n. 9, p. 2214-2231, 2023.

MEENA, J.; GUPTA, A.; AHUJA, R.; SINGH, M.; PANDA, A. K. Recent advances in nano-engineered approaches used for enzyme immobilization with enhanced activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 338, p. 116602, 2021.

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

MENDES, A. A.; FREITAS, L.; DE CARVALHO, A. K. F.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F. Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 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.

MIJONE, P. D.; BÔAS, R. N. V.; BENTO, H. B. S.; REIS, C. E. R.; DE CASTRO, H. F. Coating and incorporation of iron oxides into a magnetic-polymer composite to be used as lipase support for ester syntheses. **Renewable Energy**, v. 149, p. 1167–1173, 2020.

MILETIĆ, N.; NASTASOVIĆ, A.; LOOS, K. Immobilization of biocatalysts for enzymatic polymerizations: Possibilities, advantages, applications. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 126–135, 2012.

MOHAMED, M. A.; JAAFAR, J.; ISMAIL, A. F.; OTHMAN, M. H. D.; RAHMAN, M. A. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. **Membrane Characterization**. [s.l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 3–29.

MOKHTAR, N. F.; RAJA NOOR ZALIHA, R. N. Z. R.; MUHD NOOR, N. D.; MOHD SHARIFF, F.; ALI, M. S. M. The immobilization of lipases on porous support by adsorption and hydrophobic interaction method. **Catalysts**, v. 10, n. 7, p. 744, 2020.

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

NOGUEIRA, J. S. M.; SANTANA, V. T.; HENRIQUE, P. V.; DE AGUIAR, L. G.; SILVA, J. P. A.; MUSSATTO, S. I.; CARNEIRO, L. M. Production of 5-hydroxymethylfurfural from direct conversion of cellulose using heteropolyacid/Nb₂O₅ as Catalyst. **Catalysts**, v. 10, n. 12, p. 1–23, 2020.

OTARI, S. V.; PATEL, S. K. S.; KALIA, V. C.; LEE, J. K. One-step hydrothermal synthesis of magnetic rice straw for effective lipase immobilization and its application in esterification reaction. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122887, 2020.

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: Catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 281–288, 2007.

PENG, H.; WANG, J.; ZHANG, X.; MA, J.; SHEN, T.; LI, S.; DONG, B. A review on synthesis, characterization and application of nanoencapsulated phase change materials for thermal energy storage systems. **Applied Thermal Engineering**, v. 185, p. 116326, 2021.

PEREIRA, A. da S.; DE SOUZA, A. H.; FRAGA, J. L.; VILLENEUVE, P.; TORRES, A. G.; AMARAL, P. F. F. Lipases as Effective Green Biocatalysts for Phytosterol Esters' Production: A Review. **Catalysts MDPI**, v. 12, p. 88, 2022.

PINTO BRITO, M. J.; BAUER, L. C.; FLORES SANTOS, M. P.; SANTOS, L. S.; FERREIRA BONOMO, R. C.; DA COSTA ILHÉU FONTAN, R.; VELOSO, C. M. Lipase immobilization on activated and functionalized carbon for the aroma ester synthesis. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 309, p. 110576, 2020.

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

PORTO DE SOUZA VANDENBERGHE, L.; KARP, S. G.; BINDER PAGNONCELLI, M. G.; VON LINSINGEN TAVARES, M.; LIBARDI JUNIOR, N.; VALLADARES DIESTRA, K.; VIESSER, J. A.; SOCCOL, C. R. Classification of enzymes and catalytic properties. **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies**. [s.l.]: Elsevier, 2020. p. 11–30.

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

RANGEL, A. B. S.; SILVA, M. V. C.; DE ASSIS, G. P.; ROSA, C. M. R.; DOS SANTOS, J. C.; DE FREITAS, L. Synthesis and Characterization of Magnetic Poly(STY-EGDMA) Particles for Application as Biocatalyst Support in Octyl Oleate Ester Synthesis: Kinetic and Thermodynamic Parameters and Mathematical Modeling. **Catalysis Letters**, v. 153, n. 9, p. 1-13, 2022.

REMONATTO, D.; MIOTTI, R. H.; MONTI, R.; BASSAN, J. C.; DE PAULA, A. V. Applications of immobilized lipases in enzymatic reactors: A review. **Process Biochemistry**, v. 114, p. 1-20, 2022.

ROCHA, I. C. C. **Estudo do Equilíbrio de Fases de Sistemas Modelos e Representativos de Petróleo com CO₂ Supercrítico**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências) – Engenharia Industrial da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2014.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENGUER-MURCIA, Á.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization

mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746-770, 2019.

ROSA, C. M. R. **Síntese e caracterização de partículas poliméricas à base de estireno com propriedades magnéticas para utilização como matriz de imobilização de enzimas**. 2019. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

ROSA, C. M. R.; DA SILVA, M. V. C.; DE AGUIAR, L. G.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Prediction and comparison of textural properties of magnetic copolymer supports for enzyme immobilization. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 137, n. 41, p. 49258, 2020.

SAMPAIO, C. S.; ANGELOTTI, J. A. F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: Problems and prospects – A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 215, p. 434-449, 2022.

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

SERRANO-ARNALDOS, M.; MONTIEL, M. C.; ORTEGA-REQUENA, S.; MÁXIMO, F.; BASTIDA, J. Development and economic evaluation of an eco-friendly biocatalytic synthesis of emollient esters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 3, p. 495–505, 2020.

SHARMA, D.; KUMBHAR, B. K.; VERMA, A. K.; TEWARI, L. Optimization of critical growth parameters for enhancing extracellular lipase production by alkalophilic *Bacillus* sp. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 4, p. 205–211, 2014.

SHELDON, R. A.; BRADY, D. Green chemistry, biocatalysis, and the chemical industry of the future **ChemSusChem**, v. 15, n.9, p. e202102628, 2022.

SILVA, M. V. C.; AGUIAR, L. G.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Optimization of the parameters that affect the synthesis of magnetic copolymer styrene-divinylbenzene to be used as efficient matrix for immobilizing lipases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 169, 2018.

SILVA, M. V. C.; AGUIAR, L. G.; ROSA, C. M. R.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Kinetic study of isopropyl palmitate synthesis catalyzed by lipases immobilized on a magnetic copolymer support. **Chemical Engineering Communications**, v. 207, n. 9, p. 1329–1336, 2020.

SILVA, N. C. A.; MIRANDA, J. S.; BOLINA, I. C. A.; SILVA, W. C.; HIRATA, D. B.; DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A. Immobilization of porcine pancreatic lipase on polyhydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 82, p. 139–149, 2014.

SOARES, C. M. F.; DE CASTRO, H. F.; DE MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore silica **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 79, p. 745-757, 1999.

SOUSA, R. R.; SILVA, A. S. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: A review from

thermodynamic and kinetic perspectives. **Catalysis Science and Technology**, v. 11, n. 17, p. 5696-5711, 2021.

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

TADEVOSYAN, M.; YEGHIAZARYAN, S.; GHEVONDYAN, D.; SAGHATELYAN, A.; MARGARYAN, A.; PANOSYAN, H. Microbial thermostable hydrolases (amylases, lipases, and keratinases) and polymerases: biology and applications. **Extremozymes and their Industrial Applications**. [s.l.]: Academic Press. 2022. v. 6, p. 177–204.

TAGHIZADEH, T.; AMERI, A.; TALEBIAN-KIAKALAIEH, A.; MOJTABAVI, S.; AMERI, A.; FOROOTANFAR, H.; TARIGHI, S.; FARAMARZI, M. A. Lipase@zeolitic imidazolate framework ZIF-90: A highly stable and recyclable biocatalyst for the synthesis of fruity banana flavour. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 166, p. 1301–1311, 2021.

THANGARAJ, B.; SOLOMON, P. R. Immobilization of Lipases – A Review. Part I: Enzyme Immobilization. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 157-166, 2019.

ULUSU, N. N. Evolution of Enzyme Kinetic Mechanisms. **Journal of Molecular Evolution**, v. 80, p. 251-257, 2015.

UTAMA, Q. D.; SITANGGANG, A. B.; ADAWIYAH, D. R.; HARIYADI, P. Lipase-catalyzed interesterification for the synthesis of medium-long-medium (MLM) structured lipids - A review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 305, 2019.

VASSILIADI, E.; XENAKIS, A.; ZOUMPANIOTI, M. Chitosan hydrogels: A new and simple matrix for lipase catalysed biosyntheses. **Molecular Catalysis**, v. 445, p. 206–212, 2018.

VESCOVI, V.; DOS SANTOS, J. B. C.; TARDIOLI, P. W. Porcine pancreatic lipase hydrophobically adsorbed on octyl-silica: A robust biocatalyst for syntheses of xylose fatty acid esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 4, p. 298–305, 2017.

VILAS BÔAS, R. N.; CERON, A. A.; BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F. Application of an immobilized *Rhizopus oryzae* lipase to batch and continuous ester synthesis with a mixture of a lauric acid and fusel oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 61–68, 2018.

VILAS BÔAS, R. N.; DE CASTRO, H. F. A review of synthesis of esters with aromatic, emulsifying, and lubricant properties by biotransformation using lipases **Biotechnology and Bioengineering**, v. 119, n. 3, p. 725-742, 2022.

VILAS BÔAS, R. N.; LIMA, R. de; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; BENTO, H. B. S.; CARVALHO, A. K. F. de; DE CASTRO, H. F. Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: Lipase screening, reactor system development, and reaction optimization. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 168, p. 108568, 2021.

WAGHMARE, G. V.; CHATTERJI, A.; RATHOD, V. K. Kinetics of Enzymatic Synthesis of Cinnamyl Butyrate by Immobilized Lipase. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 183, n. 3, p. 792–806, 2017.

WANG, X.; LAN, P. C.; MA, S. Metal-Organic Frameworks for Enzyme Immobilization: Beyond Host Matrix Materials. **ACS Central Science**, v. 6, n. 9, p. 1497–1506, 2020.

XIE, W.; HUANG, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase onto graphene oxide Fe₃O₄ nanocomposite: Characterization and application for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 159, p. 42–53, 2018.

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. A general overview of support materials for enzyme immobilization: Characteristics, properties, practical utility. **CatalystsMDPI**, v. 8, n. 2, p. 92, 2018.

ZIENIUK, B.; FABISZEWSKA, A.; BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK, E. Screening of solvents for favoring hydrolytic activity of *Candida antarctica* Lipase B. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 4, p. 605–613, 2020.

ANEXOS

ANEXO A – Dados para a construção da curva de calibração (Tabela 1), curvas de calibração (Figura 1) para o ácido oleico e o hexanol e cromatogramas (Figura 2) referentes as suas calibrações.

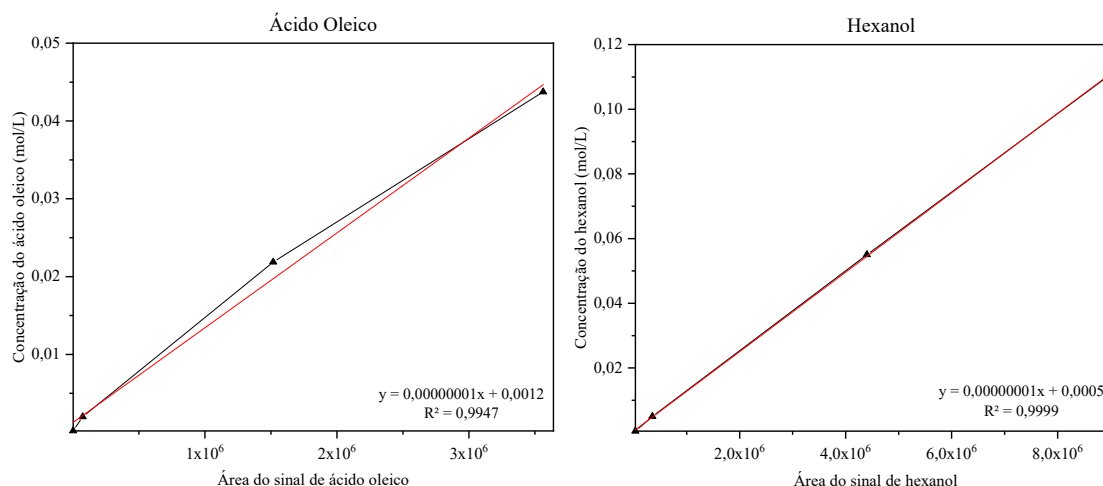
Tabela 1 – Concentração dos reagentes utilizados na construção da curva de calibração

Amostra	Ácido Oleico (mol L ⁻¹)	Hexanol (mol L ⁻¹)
1	0,043746246	0,110008210
2	0,021873123	0,055004105
3	0,001988466	0,005000373
4	0,000180770	0,000454579

Fonte: Próprio autor.

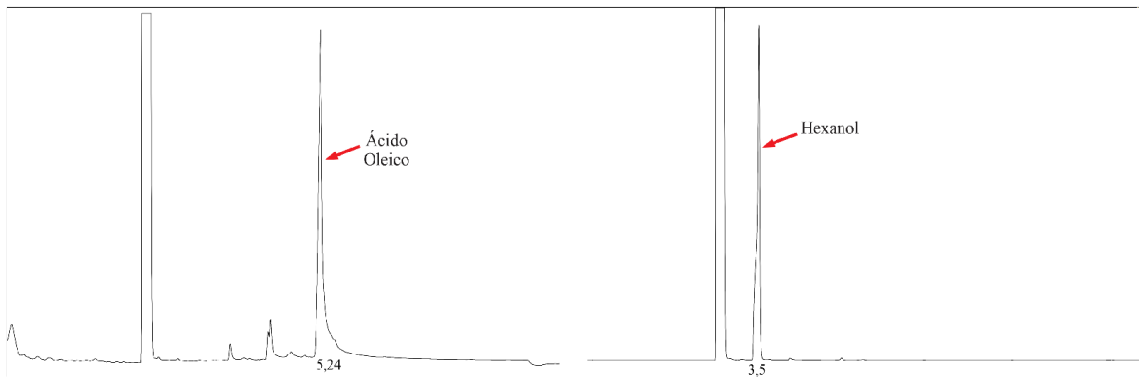
A Figura 1 mostra as curvas de calibração dos reagentes que foram obtidas plotando concentração dos reagentes *versus* as áreas dos respectivos sinais encontrados. Nos cromatogramas os coeficientes de correlação linear (R^2) foram de 0,9947 e 0,9999 respectivamente, para ácido oleico e hexanol, demonstrando assim, boa correlação entre os dados experimentais.

Figura 1 – Curva de Calibração do ácido oleico e do hexanol



Fonte: Próprio autor.

Figura 2 – Cromatogramas referentes a calibração do ácido oleico e do hexanol.



Fonte: Próprio autor