

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

AMANDA BAHIA DE SOUZA RANGEL

Síntese de ésteres emolientes catalisada por lipase imobilizada em suporte polimérico à base de estireno: Estudo experimental e modelagem matemática

Lorena
2023

AMANDA BAHIA DE SOUZA RANGEL

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 DESTES TRABALHOS, 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)

Rangel, Amanda Bahia de Souza
Síntese de ésteres emolientes catalisada por
lipase imobilizada em suporte polimérico à base de
estireno: Estudo experimental e modelagem matemática
/ Amanda Bahia de Souza Rangel; orientadora Larissa
de Freitas - Versão Corrigida. - Lorena, 2023.
97 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. Éster emoliente. 2. Lipase imobilizada. 3.
Copolímero magnetizado. 4. Modelagem matemática. 5.
Mecanismo ping-pong bi-bi. I. Título. II. de Freitas,
Larissa, orient.

Dedico este trabalho a minha família por todo amor, cuidado e amparo de sempre.

Sem vocês o caminho seria extremamente árduo.

AGRADECIMENTOS

Para as primeiras coisas, o primeiro lugar. Agradeço a Deus por me sustentar e direcionar meu caminho, por me conectar com pessoas especiais durante minha trajetória pessoal e acadêmica. Fazendo-me valer da frase: “É graça divina começar bem. Graça maior persistir na caminhada certa. Mas graça das graças é não desistir nunca” (Dom Hélder Câmara).

À Prof^ª. Dr^ª. Larissa de Freitas, pela oportunidade concedida de ser orientada por ela no mestrado e no PAE. Além do suporte acadêmico, eu não poderia deixar de agradecer o apoio constante, paciência e firmeza para direcionar meu caminho até aqui. Cruzar essa linha de chegada é fruto de seu profissionalismo.

À Prof^ª. Dr^ª. Heizir Ferreira de Castro (*in memoriam*), seu legado permanece como um farol inspirador para todos que tiveram o privilégio de conhecer sua dedicação e exemplaridade.

Ao Prof. Dr. Leandro Aguiar, pelas contribuições valiosas e disponibilidade.

À secretária do PPGEQ, Ana Beatriz Lourenço, por todo suporte e carisma dedicados a todos que passam por seu caminho.

Aos meus pais, João Mauricio e Maria Aparecida, pelo amor incondicional, pela criação com valores e incentivo diário. A vocês todo meu amor e gratidão por me proporcionarem bem mais do que podiam. Aos meus irmãos Matheus e Blenda, minha cunhada Carolina e minhas sobrinhas Manuelle e Alice. Ter vocês como família é a minha motivação.

Ao meu marido, Thiago Rangel, companheiro de vida, incentivador e apoiador de todos os meus sonhos. Dividir a caminhada com você é a maior das bênçãos que eu poderia receber.

Minha amiga e parceira de mestrado, Gabrielle Policarpo, pelo acolhimento, incentivo, suporte e disponibilidade. Para além das inúmeras contribuições com meu trabalho, me ensinou sobre ajudar, fazer o bem e cultivar bons amigos.

Minhas amigas de república, Viviane, Sanielle, Samara, Cíntia, Tatiane e Hellyn. Vocês tornaram meus dias melhores e me ensinaram a conviver com as diferenças.

Aos colegas do laboratório de Biocatálise: Mateus, Savienne, Ana Karine, Cristiano, Heitor e Rosemar. Vocês foram companhias agradáveis e suporte.

Agradeço o apoio financeiro concedido pela CAPES, a Universidade de São Paulo pelo ensino de qualidade e ao PPGEQ pela estrutura de mestrado.

RESUMO

RANGEL, A.B.S. **Síntese de ésteres emolientes catalisada por lipase imobilizada em suporte polimérico à base de estireno: Estudo experimental e modelagem matemática.** 2023. 97p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

O objetivo do trabalho foi estudar a síntese de ésteres emolientes via esterificação em meio isento de solvente empregando como biocatalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em 3 suportes híbridos magnetizados à base de estireno (STY-DVB-M, STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M). Os suportes foram sintetizados pela técnica de polimerização em suspensão, e a lipase CALB foi imobilizada a partir do método de adsorção física. Os biocatalisadores apresentaram uma faixa de atividade hidrolítica de 500 - 800 U g⁻¹ a partir da hidrólise do butirato de metila. A influência da razão molar e da temperatura (35 – 55 °C) na conversão final das sínteses foi avaliada, visando selecionar o bioprocessamento com máximo aproveitamento dos reagentes e perfil de conversão elevado para posterior desenvolvimento do modelo matemático. Inicialmente foi estudada a influência da razão molar entre os reagentes na síntese do oleato de 2-etilhexila, sendo selecionada a proporção estequiométrica como a mais adequada para dar continuidade aos estudos. Posteriormente foi avaliada a influência da temperatura na síntese dos ésteres: oleato de butila, oleato de octila e oleato de 2-etilhexila, empregando os 3 biocatalisadores. As sínteses catalisadas por CALB-STY-DVB-M e CALB-STY-EGDMA-M apresentaram perfis semelhantes em relação a influência da temperatura, atingindo maiores conversões às temperaturas mais elevadas (58 a 68% de conversão). Quando a catálise foi conduzida por CALB-STY-TEGDMA-M, notou-se um decréscimo da conversão à 55 °C, na síntese do oleato de 2-etilhexila, atingindo um máximo de 30,6 %, provavelmente devido ao caráter mais hidrofílico deste copolímero, o que pode ter causado um enfraquecimento das interações lipase/suporte, gerando perda da termoestabilidade do biocatalisador. A diferença no tamanho da cadeia carbônica e a polaridade do álcool influenciaram as taxas de esterificação do ácido oleico. Sendo o oleato de butila o mais polar dos ésteres, notou-se que quando este foi empregado como substrato foram obtidas conversões mais baixas, sugerindo que a interação com o sítio ativo da lipase pode ter sido prejudicada. Já a síntese dos ésteres oleato de octila e 2-etilhexila foram, possivelmente, favorecidas pela maior afinidade que a lipase CALB demonstrou por álcoois com cadeia carbônica mais longa, ou seja, para meios reacionais mais apolares. A escolha do bioprocessamento para a construção da modelagem levou em consideração as máximas conversões de reação atingidas e a aplicação de novas matrizes poliméricas para imobilização de lipases. Sendo assim, foi selecionado o bioprocessamento empregado para a síntese do éster emoliente oleato de octila, utilizando como biocatalisador o CALB-STY-EGDMA-M. Para a construção do modelo cinético, inicialmente a constante de equilíbrio foi estimada para 35 °C, permitindo calcular a entalpia global da reação por *Van't Hoff* ($\Delta H = 104,60 \times 10^3 \text{ KJ mol}^{-1}$) e ajustar os demais parâmetros pelas equações de *Arrhenius* e *Ping-Pong Bi-Bi*, obtendo-se 9 parâmetros. O melhor ajuste ($AIC_C = 129,6490$), dentre as possibilidades de arranjo, foi obtido para mensurar a qualidade do modelo. A obtenção dos cromatogramas permitiu confirmar a influência da temperatura na formação do éster oleato de octila.

Palavras-chave: Éster emoliente. Lipase imobilizada. Copolímero magnetizado. Modelagem matemática. Mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.

ABSTRACT

RANGEL, A.B.S. **Synthesis of emollient esters catalyzed by lipase immobilized on a styrene-based polymeric support: experimental study and mathematical modeling.** 2023. 97p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The objective of this work was to study the synthesis of emollient esters via esterification in a solvent-free medium using lipase B from *Candida antarctica* (CALB) immobilized on 3 magnetized styrene-based hybrid supports (STY-DVB-M, STY-EGDMA -M and STY-TEGDMA-M). The supports were synthesized by the suspension polymerization technique, and the CALB lipase was immobilized using the physical adsorption method. The biocatalysts showed a hydrolytic activity range of 500 - 800 U g⁻¹ from the hydrolysis of methyl butyrate. The influence of the molar ratio and temperature (35 – 55 °C) on the final conversion of the syntheses was evaluated, aiming to select the bioprocess with maximum use of reagents and a high conversion profile for subsequent development of the mathematical model. Initially, the influence of the molar ratio between the reagents on the synthesis of 2-ethylhexyl oleate was studied, and the stoichiometric proportion was selected as the most adequate to continue the studies. Subsequently, the influence of temperature on the synthesis of esters was evaluated: butyl oleate, octyl oleate and 2-ethylhexyl oleate, using the 3 biocatalysts. The syntheses catalyzed by CALB-STY-DVB-M and CALB-STY-EGDMA-M showed similar profiles regarding the influence of temperature, reaching higher conversions at higher temperatures (58 to 68% conversion). When the catalysis was carried out by CALB-STY-TEGDMA-M, a decrease in conversion at 55 °C was observed in the synthesis of 2-ethylhexyl oleate, reaching a maximum of 30.6%, probably due to the more hydrophilic character of this copolymer, which may have caused a weakening of lipase/support interactions, leading to loss of thermostability of the biocatalyst. The difference in carbon chain size and alcohol polarity influenced the esterification rates of oleic acid. Since butyl oleate is the most polar of the esters, it was noted that when it was used as a substrate, lower conversions were obtained, suggesting that the interaction with the active site of the lipase may have been impaired. The synthesis of octyl oleate and 2-ethylhexyl esters were possibly favored by the greater affinity that the CALB lipase showed for alcohols with a longer carbon chain, that is, for more apolar reaction media. The choice of bioprocess for the construction of the model took into account the maximum reaction conversions achieved and the application of new polymeric matrices for immobilization of lipases. Therefore, the bioprocess used for the synthesis of the emollient octyl oleate ester was selected, using CALB-STY-EGDMA-M as a biocatalyst. For the construction of the kinetic model, initially the equilibrium constant was estimated at 35 °C, allowing the calculation of the global enthalpy of the reaction by Van't Hoff ($\Delta H = 104.60 \times 10^3$ KJ mol⁻¹) and adjusting the other parameters by Arrhenius and Ping-Pong Bi-Bi equations, obtaining 9 parameters. The best fit (AICC = 129.6490), among the possible arrangements, was obtained to measure the quality of the model. The chromatograms confirmed the influence of temperature on the octyl oleate ester formation.

Keywords: Emollient ester. Immobilized lipase. Magnetized copolymer. Mathematical modelling. Ping-Pong Bi-Bi mechanism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Síntese de éster: a) Reação de esterificação de um ácido carboxílico com um álcool e b) reação de transesterificação de um éster e um álcool.	22
Figura 2 - Reações catalisadas por lipases.	29
Figura 3 - Representação dos principais processos de imobilização de enzimas em suportes sólidos.	31
Figura 4 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-DVB.	37
Figura 5 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-EGDMA.	37
Figura 6 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-TEGDMA.	37
Figura 7 - Mecanismo cinético de Ping-Pong Bi-Bi.	43
Figura 8 - Etapas experimentais desenvolvidas.	47
Figura 9 - Aparato experimental utilizado para síntese dos suportes	49
Figura 10 - Imobilização da lipase nos copolímeros magnetizados: (a) Copolímeros embebidos em heptano; (b) Derivado imobilizado obtido após etapa de secagem.	51
Figura 11 - Frasco utilizado para a realização das reações de esterificação*.	52
Figura 12 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de 2-etilhexila empregando diferentes razões molares, catalisada por CALB-STY-DVB-M (10% m/v de biocatalisador, sob 50 °C e agitação de 150 rpm).	60
Figura 13 - Influência do incremento da temperatura na conversão máxima do ácido oleico na reação de esterificação na síntese do oleato de butila empregando os biocatalisadores CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M.	63
Figura 14 - Influência do incremento de temperatura no desempenho dos biocatalisadores na síntese do oleato de butila: a) CALB-STY-DVB-M, b) CALB-STY-EGDMA-M e c) CALB-STY-TEGDMA-M.	64
Figura 15 - Influência do incremento da temperatura na conversão máxima do ácido oleico na reação de esterificação na síntese do oleato de octila empregando os biocatalisadores CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M.	66
Figura 16 - Influência do incremento de temperatura no desempenho dos biocatalisadores na síntese do oleato de octila: a) CALB-STY-DVB-M, b) CALB-STY-EGDMA-M e c) CALB-STY-TEGDMA-M.	67

Figura 17 - Influência do incremento da temperatura na conversão máxima do ácido oleico na reação de esterificação na síntese do oleato de 2-etilhexila empregando os biocatalisadores CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M.....	69
Figura 18 - Influência do incremento de temperatura no desempenho dos biocatalisadores na síntese do oleato de 2-etilhexila: a) CALB-STY-DVB-M, b) CALB-STY-EGDMA-M e c) CALB-STY-TEGDMA-M.....	71
Figura 19 - Resultados obtidos para a síntese do oleato de octila utilizando o CALB-STY-EGDMA-M como catalisador, em diferentes temperaturas. Dados obtidos experimentalmente (• EXP) e para o Ajuste obtido pelo modelo (— MOD).	74
Figura 20 - Cromatogramas obtidos na síntese do oleato de octila empregando o biocatalisador CALB-STY-EGDMA-M a: a) 45°C b) 50 °C e c) 55 °C.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções mássicas utilizadas nas reações de polimerização para obtenção de cada copolímero magnetizado.....	50
Tabela 2 - Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do oleato de octila.	55
Tabela 3 - Atividade enzimática, rendimento de imobilização e umidade dos biocatalisadores desenvolvidos.	57
Tabela 4 - Propriedades físicas dos copolímeros magnetizados.	58
Tabela 5 - Concentrações e produtividades em éster obtida nos diferentes sistemas reacionais em 24 h de reação.	61
Tabela 6 - Constantes cinéticas obtidas por Lopresto <i>et al.</i> (2014) para o mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi.	73
Tabela 7 - Valores do Critério de Akaike corrigido (AICc) para diferentes ajustes do modelo cinético da síntese do éster oleato de octila catalisada por CALB-STY-EGDMA-M.	75
Tabela 8 - Melhores ajustes de parâmetros obtidos para a modelagem cinética empregando-se Ping-Pong Bi-Bi para a síntese do éster oleato de octila catalisada por CALB-STY-EGDMA-M.....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Ésteres emolientes e suas aplicações no setor cosmético.....	21
Quadro 2 - Síntese enzimática de ésteres de interesse industrial, obtidos via reação de esterificação.....	25
Quadro 3 - Utilização de matrizes poliméricas como suporte para imobilização de lipases. ..	36
Quadro 4 - Utilização de matrizes poliméricas magnetizadas como suporte para imobilização de lipases.	39
Quadro 5 - Principais equipamentos utilizados na realização do trabalho.	46

LISTA DE ABREVIACOES

gua UP	gua ultrapura
AIBN	Azobisisobutironitrila
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> (Tipo B).
DVB	Divinilbenzeno
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
TEGDMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
PVA	lcool polivinílico
STY	Estireno
STY-DVB-M	Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno edivinilbenzeno
STY-EGDMA-M	Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno e dimetacrilato de etilenoglicol
STY-TEGDMA-M	Copolímero magnetizado com magnetita  base de estireno e Dimetacrilato de trietilenoglicol
CALB-STY-DVB-M	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em Copolímero magnetizado à base de estireno e Divinilbenzeno
CALB-STY-EGDMA-M	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em Copolímero magnetizado à base de estireno e Dimetacrilato de etilenoglicol
CALB-STY-TEGDMA-M	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em Copolímero magnetizado à base de estireno e Dimetacrilato de trietilenoglicol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	Ésteres emolientes.....	20
3.1.1	Rotas de produção de ésteres	21
3.1.1.1	Obtenção de ésteres via catálise química.....	22
3.1.1.2	Obtenção de ésteres via catálise enzimática.....	23
3.1.1.2.1	Fatores que influenciam a obtenção de ésteres via catálise enzimática.....	25
3.2	Lipases	28
3.3	Imobilização de enzimas	30
3.4	Suportes de imobilização	32
3.4.1	Polímeros.....	33
3.4.1.1	Suportes poliméricos.....	35
3.4.1.2	Polímeros magnetizados.....	38
3.5	Modelagem matemática	40
3.5.1	Modelagem cinética de reações enzimáticas.....	41
4	MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1	Materiais.....	45
4.1.1	Síntese dos suportes.....	45
4.1.2	Imobilização da Enzima	45
4.1.3	Demais reagentes.....	45
4.2	Equipamentos.....	45
4.3	Metodologia Experimental.....	46
4.3.1	Purificação do AIBN.....	48
4.3.2	Síntese da Magnetita: Co-Precipitação dos íons Fe ⁺² e Fe ⁺³	48
4.3.2.1	Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico	48
4.3.3	Síntese dos copolímeros magnéticos à base de estireno	49
4.3.4	Imobilização da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CalB) em suporte polimérico	50
4.3.5	Síntese dos ésteres emolientes oleato de butila, oleato de 2-etilhexila e oleato de octila conduzida em frascos agitados.....	51
4.4	Métodos de Análise.....	52
4.4.1	Classificação granulométrica	52

4.4.2 Teor de umidade	52
4.4.3 Atividade hidrolítica	52
4.4.4 Rendimento de imobilização	53
4.4.5 Acompanhamento das reações de esterificação.....	53
4.4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos do bioprocesso	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
5.1 Características do suporte e dos biocatalisadores desenvolvidos.....	57
5.2 Síntese enzimática dos ésteres emolientes.....	59
5.2.1 Influência da razão molar	59
5.2.2 Influência da temperatura	61
5.2.2.1 Síntese do oleato de butila	62
5.2.2.2 Síntese do oleato de octila	65
5.2.2.3 Síntese do oleato de 2-etilhexila.....	68
5.3. Seleção do melhor bioprocesso para a síntese de éster emoliente.....	72
5.4 Modelagem cinética empregando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi.....	73
5.5 Quantificação do éster oleato de octila por cromatografia em fase gasosa.....	78
6 CONCLUSÕES.....	80
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	82
REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

Lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3), enzimas pertencentes à classe das hidrolases, destacam-se dentre as demais, por serem capazes de catalisar reações de hidrólise de óleos e gorduras além de reações de esterificação e transesterificação, exibindo ampla aplicação industrial nos setores alimentício, farmacêutico, têxtil, cosmético e de detergentes. São biocatalisadores eficazes devido à elevada atividade específica pelo substrato, estereoseletividade e baixo impacto ao meio ambiente (CHANDRA, *et al.*, 2020; CORTEZ *et al.*, 2018; TREVISAN, 2014).

A utilização de condições amenas de processos e a redução da geração de subprodutos e efluentes tóxicos são provavelmente vantagens relevantes na substituição de tecnologias químicas pelas bioquímicas, proporcionando a obtenção de produtos por processos “verdes” (SHELDON; BRADY, 2022; WILTSCHI *et al.*, 2020; POPPE *et al.*, 2015; CHOI; HAN; KIM, 2015). Entretanto, algumas dificuldades são encontradas nesse tipo de processo, como por exemplo, a recuperação do biocatalisador, a solubilidade da enzima em alguns meios reacionais e a desnaturação provocada por fatores específicos (DA SILVA *et al.*, 2020). Para solucionar estas limitações, a técnica de imobilização enzimática permite confinar fisicamente enzimas, retendo sua atividade catalítica, possibilitando sua utilização de forma repetida, elevando sua estabilidade térmica, além de facilitar a separação do meio reacional (RODRIGUES, *et al.*, 2019; CORTEZ *et al.*, 2018; DE CASTRO *et al.*, 2010).

Dentre os diferentes tipos de suportes estudados para imobilização de enzimas, os materiais híbridos ganham destaque por apresentarem as vantagens combinadas dos materiais orgânicos e inorgânicos. Nesta classe de materiais se encontram os compósitos magnéticos, constituídos basicamente por um núcleo magnético envolvido por uma camada de polímero. Estas partículas vêm sendo estudadas para diversas finalidades, incluindo aplicações tecnológicas, industriais, ambientais, biológicas e médicas. No campo da biocatálise, destacam-se por fornecerem uma matriz para imobilização de enzimas com fácil recuperação por meio da aplicação de um campo magnético externo (MIJONE *et al.*, 2020; SREEHARSHA *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018a; BENTO *et al.*, 2017; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

A síntese de ésteres catalisada por lipases imobilizadas é muito atraente, visto que fornece produtos mais puros, sem coloração e odores, atua em condições amenas de pH e temperatura, além de não gerar subprodutos (PEREIRA *et al.*, 2022; REYES-REYES; BARRANCO; SANDOVAL, 2022; KHAN; RATHOD, 2015). Além disso, a realização da síntese enzimática em meio isento de solventes, possui vantagens adicionais em relação ao método clássico tradicional, como o não uso de reagentes químicos adicionais, o que minimiza

as etapas de downstream, reduzindo o custo total do processo e o impacto ambiental. Possibilita a obtenção de rendimentos mais elevados, menor tempo de reação, maior seletividade, consumo máximo de reagentes, além de requerer menor quantidade de energia para promover a reação, visto que, ocorre maior número de colisões entre os reagentes (NIETO *et al.*, 2023; KHARISSOVA *et al.*, 2019; ORTEGA-REQUENA *et al.*, 2014).

Dentre os diversos tipos de ésteres, os emolientes, tais como o oleato de 2-etil-hexila, são muito utilizados na indústria cosmética para formulação de cremes, loções, filtros solares, antitranspirantes, maquiagens entre outros. São biodegradáveis, não tóxicos e apresentam boa solubilidade em gorduras e óleos, mantendo a maciez, a plasticidade, a hidratação e restauração da oleosidade da pele (ZHENG *et al.*, 2019; CHAO *et al.*, 2018).

O desempenho de um bioprocessos depende de uma série de fatores, tais como: razão molar (ácido:álcool), pH, temperatura, concentração de biocatalisador, teor de água, tipo de enzima, suporte e método de imobilização utilizado. Nesse contexto, estudos têm sido conduzidos com o objetivo de determinar as condições ótimas da produção de ésteres empregando lipases. Para compreender tais condições é necessário conhecer e entender a cinética desta reação e o comportamento termodinâmico, que permitirá esclarecer a natureza do mecanismo da reação, bem como a energia envolvida para sua ocorrência (LIMA; PERES; MENDES, 2018; ALVES; CREN; MENDES, 2016).

Diversos trabalhos documentados na literatura reportam a preparação de biocatalisadores ativos a partir da imobilização de lipases em matrizes poliméricas, para aplicação na síntese de ésteres (ROSA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018b; BENTO *et al.*, 2017; LAGE *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2014). Entretanto, estudos mais detalhados sob o ponto de vista cinético e termodinâmico devem ser explorados, contribuindo para a construção de modelos preditivos, simulação de bioprocessos e possível implementação em escala industrial.

Nesse cenário, o presente trabalho teve como propósito sintetizar ésteres emolientes via esterificação em meio isento de solvente empregando como biocatalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em diferentes suportes híbridos magnetizados à base de estireno, sendo eles: poli(estireno-co-divinilbenzeno), poli(estireno-co-dimetacrilato de etilenoglicol) e poli(estireno-co-dimetacrilato de trietilenoglicol). O bioprocessos do éster oleato de octila, empregando como biocatalisador a lipase CALB imobilizada em poli(estireno-co-dimetacrilato de etilenoglicol), foi selecionado para o desenvolvimento do modelo cinético aplicando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi e a Equação de *Van't Hoff* para a determinação dos parâmetros termodinâmicos da reação.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo geral estudar a síntese de ésteres emolientes via esterificação, em meio isento de solvente, empregando como biocatalisador a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em diferentes suportes híbridos magnetizados à base de estireno. As sínteses foram avaliadas em função de suas melhores condições operacionais, visando a obtenção das máximas conversões. Além disso, foi desenvolvida a modelagem cinética e determinados os parâmetros termodinâmicos do bioprocessos selecionado como mais adequado. Os seguintes objetivos específicos foram executados:

- Síntese dos suportes poliméricos à base de estireno empregando diferentes agentes reticulantes, sendo eles: divinilbenzeno (DVB), dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) e dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), magnetizados pela coprecipitação dos íons de Fe^{+2} e Fe^{+3} em meio alcalino.
- Imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB), nos diferentes suportes poliméricos obtidos, empregando a técnica de adsorção física.
- Síntese dos ésteres emolientes via esterificação, buscando as melhores condições operacionais, mediante a avaliação da influência da razão molar e do incremento de temperatura na conversão final das sínteses. Os ésteres sintetizados foram: oleato de butila, oleato de octila e oleato de 2-etilhexila.
- Seleção do melhor bioprocessos para a construção e avaliação de um modelo cinético mediante a aplicação do mecanismo Ping-Pong Bi-Bi, agregando os parâmetros termodinâmicos específicos.
- Validação do modelo matemático por meio da aplicação do critério de Akaike, a fim de estabelecer o melhor ajuste do modelo proposto e maior conformidade com os dados experimentais.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Ésteres emolientes

Ésteres são importantes compostos químicos, e o interesse por eles deve-se principalmente à sua ampla aplicação em diferentes segmentos industriais, atuando como intermediários na indústria química, de alimentos, cosméticos, farmacológica, entre outros (REN; LAMSAL, 2017; LAGE *et al.*, 2016; CHOWDHURY *et al.*, 2014). São substâncias que apresentam excelente desempenho técnico associado às propriedades ecológicas satisfatórias, por se tratarem de compostos de fácil degradação, além de possuírem baixa toxicidade (SOONG *et al.*, 2022).

Dentre a classe de ésteres, os emolientes, formados por cadeias carbônicas longas, têm um importante destaque no setor cosmético (Quadro 1), devido sua não toxicidade, biodegradabilidade e boa solubilidade em gordura, responsáveis por manter a maciez, plasticidade, hidratação e restauração da oleosidade da pele, sendo muito empregados em formulações de *skincare* (CHAO *et al.*, 2018; NISHAT; VIRENDRA, 2015; GORCEA; LAURA, 2013). As cadeias carbônicas dos ácidos graxos constituintes dos ésteres emolientes, geralmente variam entre o láurico (C12:0) e o linoleico (C18:2). Essa limitação de números de carbonos na cadeia é devida aos ácidos graxos de cadeias menores, não apresentarem a propriedade lubrificante; enquanto que ésteres de cadeias maiores apresentam ponto de fusão acima da temperatura da pele, inviabilizando sua aplicação (KHAN; RHATOD, 2015; SCHUELLER; ROMANOWSKI, 1999).

Quando aplicados à pele humana, os ésteres emolientes promovem a melhora da sua aparência, suavizando a pele ressecada, em função da sua excelente propriedade de molhabilidade. Por esta razão, são utilizados em diferentes produtos cosméticos, tais como condicionadores, hidratantes, loções, desodorantes, protetores solares e batons. Constituem cerca de 3 a 25 % (m/m) da composição do produto, sendo o segundo maior constituinte, já que a água é o primeiro (KHAN; RHATOD, 2015; BAREL; PAYE; MAIBACH, 2014; LANZENDORFER, 2002).

Quadro 1 - Ésteres emolientes e suas aplicações no setor cosmético.

Nome	Obtenção sintética	Aplicação	Referência
Estearato de octila	Ácido estearílico e álcool octílico	Confere espalhabilidade em cosméticos faciais, corporais e capilar	MURCIA <i>et al.</i> , 2020
Miristato de isopropila	Ácido mirístico e álcool isopropílico	Cremes e loções para o cuidado da pele	SILVA <i>et al.</i> , 2018a
Oleato de decila	ácido oleico e álcool decílico	Solubilizante em produtos de tratamento facial, máscara para cabelos e produtos para barbear	MIGUEZ <i>et al.</i> , 2018
Oleato de 2-etilhexila	Ácido oleico e 2-etilhexanol	Agente de controle de viscosidade em produtos com elevado teor de gordura	DA SILVA <i>et al.</i> , 2021
Palmitato de 2-etilhexila	Ácido palmítico e 2-etilhexanol	Adequado para aplicações em peles secas e excelente propriedade de espalhamento	RICHETTI, 2009
Palmitato de cetila	ácido hexadecanóico e hexadecanol	Confere consistência e propriedades lubrificantes em produtos para pele e cabelo	MUTLU; YILMAZ, 2016
Palmitato de isopropila	ácido palmítico e isopropanol	Diluyente, lubrificante e dispersante para óleos vegetais, óleos de silicones e óleos minerais	MUSTAFA; NIKURA, 2022

Fonte: Próprio autor.

3.1.1 Rotas de produção de ésteres

Ésteres podem ser obtidos a partir de fontes naturais ou sintéticas. Quando obtido de uma fonte natural, sua extração gera custo elevado e a pequena quantidade extraída faz com que a utilização industrial seja inadequada. Dessa forma, a produção sintética de ésteres é muito utilizada, podendo ser realizada por meio de diversas reações, sendo as mais importantes a

transesterificação e a esterificação (KHAN *et al.*, 2021). A produção de ésteres sintéticos a partir de fontes renováveis tem sido realizada com aplicação de catalisadores homogêneos e heterogêneos (ATTIA *et al.*, 2020; LAGE *et al.*, 2016).

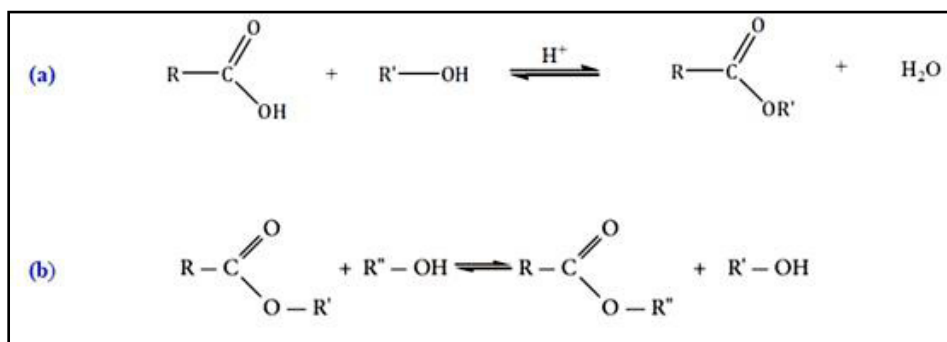
As sínteses de ésteres geralmente ocorrem em sistemas com baixo teor de água, podem empregar diferentes solventes orgânicos ou serem realizadas em meio isento de solvente, além da necessidade da utilização de um catalisador adequado em função da baixa velocidade de síntese (ZAGO *et al.*, 2021; SOUSA *et al.*, 2021).

Os catalisadores mais comumente utilizados em processos químicos convencionais são ácidos ou álcalis, entretanto a biotecnologia tem proporcionado a expansão da aplicabilidade de enzimas com elevado poder catalítico (MANDARI; DEVARAI, 2022; CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018).

3.1.1.1 Obtenção de ésteres via catálise química

A maioria das indústrias produtoras de ésteres utiliza processos que empregam temperaturas elevadas (150-240°C) e catalisadores ácidos ou básicos. Ésteres podem ser obtidos por esterificação direta ou transesterificação (Figura 1) e em ambas as rotas os catalisadores mais utilizados são hidróxido de sódio ou potássio, hidróxidos e alcóxidos de metais, carbonatos, acetatos e diferentes ácidos. Por tratar-se de uma catálise homogênea, a purificação dos produtos da reação torna o processo oneroso, além de gerar produtos com baixo grau de pureza (ALSULTAN *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2021).

Figura 1 - Síntese de éster: a) Reação de esterificação de um ácido carboxílico com um álcool e b) reação de transesterificação de um éster e um álcool.



Fonte: MACHADO, 2018.

A esterificação é um processo químico que envolve um ácido orgânico ou inorgânico e um álcool. O método mais utilizado é a reação de um ácido carboxílico e um álcool e consiste

em um processo lento e reversível, com um rendimento de cerca de 60% (SILVA *et al.*, 2010; CAVALCANTE, 2015). Um aspecto a ser notado na reação de esterificação é que o subproduto da reação é a água, diferentemente da reação de transesterificação que gera a parte alcoólica do éster (por exemplo, glicerol no caso de triacilgliceróis), o que representa uma vantagem ambiental (CAVALCANTE, 2015).

O processo de esterificação é utilizado na obtenção de ésteres de interesse comercial, sobretudo os solventes, diluentes, plastificantes, surfactantes, polímeros, essências e fragrâncias sintéticas, intermediário químico para indústrias, de herbicidas e de pesticidas. É um processo bastante difundido, muito utilizado especialmente pelas indústrias farmacêuticas e de perfumarias (SILVA *et al.*, 2010).

A utilização de catalisadores alcalinos, sobretudo a soda cáustica ou outras bases fortes, são os mais utilizados nas reações de transesterificação, em virtude dos baixos custos e rapidez que catalisam o processo (SUAREZ *et al.*, 2009). A taxa de conversão dos catalisadores básicos é 4000 vezes maior do que os catalisadores ácidos e o custo das bases são bastante inferiores aos demais catalisadores (ALVES, 2010). O processo de transesterificação alcalina apresenta algumas dificuldades, como a necessidade da elevada pureza das matérias-primas, que devem estar praticamente isentas de ácidos graxos livres, fosfatídeos e água, o que pode comprometer o futuro da hegemonia dessa tecnologia (SUAREZ *et al.*, 2009).

Em geral, a produção de éster via catálise química, pode gerar produtos com baixa qualidade, contendo componentes agressivos para a pele e à saúde humana, sendo necessárias etapas posteriores de purificação, acarretando um maior custo de produção (KHAN; RATHOD, 2015). Devido a estas desvantagens, faz-se necessária a busca por novas formas de sintetizar ésteres para aplicação industrial, e uma alternativa interessante é a síntese catalisada por lipases (NOVAK *et al.*, 2016).

3.1.1.2 Obtenção de ésteres via catálise enzimática

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente pelos estudos desenvolvidos em biotecnologia, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (SANTOS *et al.*, 2019; JAVED *et al.*, 2018; ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016). O Quadro 2 ilustra alguns estudos sobre a síntese de ésteres via catálise enzimática.

Do ponto de vista industrial, catalisadores heterogêneos são mais atrativos devido à maior facilidade de recuperação e baixa geração de resíduos químicos. Dentre eles, a aplicação

de lipases imobilizadas como catalisador heterogêneo tem-se mostrado bastante promissora em função da alta atividade, especificidade para substratos naturais e sintéticos, elevada estabilidade em solventes orgânicos e utilização de condições brandas de reação (ADLERCREUTZ, 2013; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2010).

Além disso, a síntese enzimática de ésteres evita a formação de componentes de coloração escura produzidos em reações empregando catalisadores heterogêneos ácidos, como resina funcionalizada com ácido sulfônico, que exigem etapas subsequentes de purificação como o branqueamento e a desodorização (AKERMAN *et al.*, 2011). O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (BBC RESEARCH, 2019; CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; GEOFFRY *et al.*, 2018).

Quadro 2 - Síntese enzimática de ésteres de interesse industrial, obtidos via reação de esterificação.

Biocatalisador	Éster	Descrição do trabalho	Reator	Referência
Lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em organossílica mesoporosa	Levulinato de dodecil	Foram obtidos rendimentos superiores à 77,62% na síntese realizada em meio isento de solvente e sob temperatura de 51,2 °C.	Batelada	JIANG <i>et al.</i> , 2019
Lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno)	Miristato de isopropila	Rendimentos próximos a 100% foram obtidos em meio isento de solvente a 50 °C.	Leito empacotado em fluxo contínuo	SILVA <i>et al.</i> , 2018a
<i>Candida rugosa</i> imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno)	Butirato de butila	Obteve-se conversão total em algumas condições testadas, em meio heptano, na faixa de 31 - 59 °C.	Batelada	BENTO <i>et al.</i> , 2017
Lipase B de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em nanopartículas de poli (ureia-uretano)	Oleato e propionato de geranilo	Obtiveram-se rendimentos entre 82 e 93%, em reação isenta de solvente, sob temperatura de 50 °C.	Batelada	CHIARADIA <i>et al.</i> , 2016
Lipase de <i>Candida sp.</i> 99-125 imobilizada em tecido de algodão	Palmitato de 2-etilhexila	Rendimentos superiores à 90% foram obtidos em sistema isento de solvente, sob 50 °C.	Leito empacotado em fluxo contínuo	SHENG <i>et al.</i> , 2015

Fonte: Modificado (Rodrigues *et al.*, 2019).

3.1.1.2.1 Fatores que influenciam a obtenção de ésteres via catálise enzimática

Para que a produção de ésteres seja economicamente viável em escala industrial, esta deve atender no mínimo, aos seguintes critérios: expressar bom rendimento, gerar pouco subproduto, apresentar balanço energético favorável e minimizar os impactos ao meio ambiente. Entretanto, esses critérios dificilmente são atendidos empregando-se métodos convencionais de produção de ésteres, via catálise química (LAMSA, 1995). Dessa forma, nos últimos anos, a biocatálise vem fornecendo tecnologias sustentáveis mediante o uso de enzimas seletivas, possibilitando a transição de processos químicos convencionais para processos ambientalmente amigáveis (XIAO *et al.*, 2015; BAI *et al.*, 2014).

No âmbito da tecnologia enzimática, a avaliação dos perfis de conversão da reação pode ser realizada em função de alguns parâmetros reacionais, tais como emprego ou não de solvente, temperatura reacional e razão molar dos reagentes do processo. Esses fatores podem prever a realização de um bioprocessamento bem sucedido, contribuindo para sua viabilidade. Além disso, deve-se atentar para o aproveitamento máximo dos substratos e da manutenção da atividade enzimática do biocatalisador (CASTRO; SATO, 2013; CHANG *et al.*, 2013).

Solvente

Reações conduzidas em meio isento de solvente, são processos ambientalmente favoráveis, uma vez que não apresentam toxicidade, inflamabilidade, ou custos de recuperação e reciclagem do composto orgânico (SANTOS *et al.*, 2007). Além disso, são mais vantajosos, pois há menor quantidade de componentes envolvidos, tornando o processo mais econômico (STERGIOU *et al.*, 2013; GUVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002).

A principal preocupação da utilização de solventes está relacionada com a sua toxicidade e o setor de aplicação, como por exemplo, em indústrias cosméticas, que exigem produtos com alta pureza e livres de quaisquer contaminações (CHOI; HAN; KIM, 2015; MONTIEL *et al.*, 2015; ANSORGE-SCHUMACHER; THUM, 2013). Uma alternativa viável é conduzir o bioprocessamento em sistema livre de solvente, mesmo que, seja necessário utilizar excesso de um dos reagentes, para que atue tanto como substrato como solvente no meio reacional (GUVENÇ; KAPUCU; MEHMETOGLU, 2002).

Segundo Bezbradica *et al.* (2017) e Stergiou *et al.* (2013), uma grande variedade de compostos orgânicos e suas misturas já foram testados para processos que visam a síntese de ésteres. A escolha do melhor solvente depende da enzima, das propriedades físico-químicas dos substratos utilizados e da temperatura do sistema. Destaca-se que, o solvente orgânico

selecionado não deve afetar a camada de hidratação da enzima, necessária para manter sua conformação nativa.

Os solventes orgânicos comumente empregados em reações de esterificação catalisadas por lipases incluem benzeno, tolueno, n-hexano, ciclohexano, heptano, octano, isooctano, éter de petróleo, acetona, clorofórmio, etil acetato, entre outros (KUMAR, 2016). As reações enzimáticas que fazem uso de tais solventes são afetadas pela polaridade do solvente, de modo que, a maior atividade do biocatalisador é atingida em solventes relativamente hidrofóbicos, e nenhuma ou baixa atividade é observada em solventes mais hidrofílicos (WANG *et al.*, 2016).

Embora alguns solventes utilizados, sejam anidros, eles também podem conter traços de água. Dependendo da quantidade de água presente, além de afetar a enzima, pode também favorecer a reação de hidrólise. Apesar de uma quantidade mínima de água ser necessária para manter a estrutura das lipases (água essencial para sua hidratação), a reação de esterificação possui um equilíbrio, e o excesso de água no meio, pode hidrolisar o éster (VILAS BÔAS *et al.*, 2017; FREITAS, *et al.*, 2011; GANDHI *et al.*, 2000).

Quando os solventes e os substratos são muito polares, pode ocorrer a redução da camada de hidratação da enzima, desnaturando-a e diminuindo o seu poder de catálise.

O coeficiente de partição ($\log P$) é uma medida de polaridade muito utilizada para selecionar solventes para as mais diversas reações. Os mais adequados para síntese de ésteres empregando lipases, geralmente possuem $\log P$ superior a 4 (STERGIOU *et al.*, 2013).

Razão molar

A escolha da razão molar entre os reagentes empregada na síntese enzimática de ésteres está diretamente relacionada à conversão final da reação. Ressalta-se que, numa reação de esterificação, o aumento da quantidade de álcool pode reduzir a conversão, devido ao seu caráter polar, em função da presença do grupo OH. Isso porque, o álcool apresenta interação hidrofílica com a camada de água presente na superfície da enzima, causando alterações em sua estrutura proteica, podendo ocasionar redução de sua atividade ou até mesmo inibição. Por outro lado, ao elevar a quantidade do ácido, promoverá um aumento na viscosidade da mistura reacional, afetando a transferência de massa (KIM *et al.*, 2019; KHAN; RHATOD, 2015).

Temperatura

Na condução de bioprocessos, geralmente é selecionada uma temperatura ótima baseada no tipo de substrato e no biocatalisador que será empregado na reação. Com relação ao substrato, o uso de ácidos graxos e de alcoóis de cadeia longa, necessitará de temperaturas do meio reacional mais elevadas, quando comparado ao emprego de ácidos graxos e alcoóis de cadeia curta, devido à sua maior viscosidade (AGUIEIRAS *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2011).

Em relação às enzimas, a maioria tem sua atividade reduzida em temperaturas muito elevadas, devido a ocorrência de alterações na sua estrutura tridimensional, podendo levar a desnaturação. Portanto, é necessário trabalhar em condições ótimas de temperatura, na qual a atividade enzimática se mantenha por um maior período de tempo (LEHNINGER; NELSON; COX, 2011; WHITAKER, 1993).

Particularmente, a síntese enzimática de ésteres catalisada pela lipase B de *Candida antarctica*, deve ser conduzida a temperaturas na faixa de 40 a 60 °C (KHAN; RHATOD, 2015).

3.2 Lipases

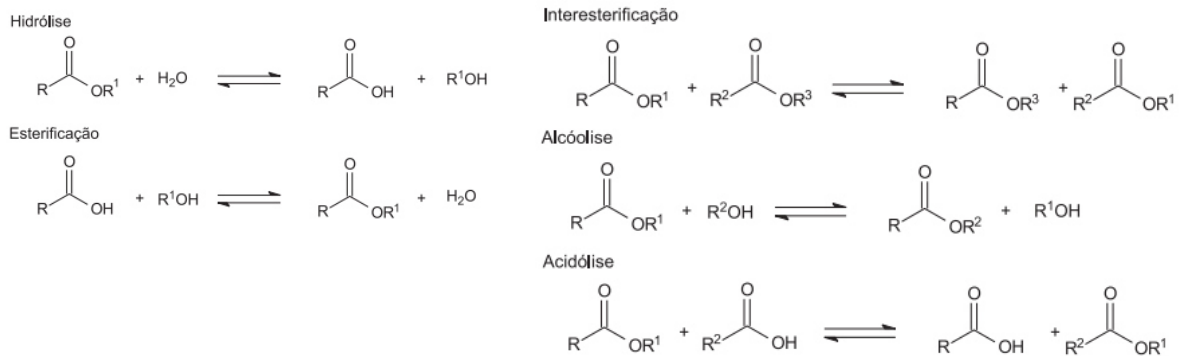
As lipases (triacilglicerol ester hidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas que atuam na hidrólise de óleos e gorduras liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol, além de catalisarem reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, dependendo do tipo do substrato e das condições do meio ao qual estão atuando (Figura 2). A quantidade de água no meio reacional é um dos fatores determinantes para o sucesso de cada uma dessas reações. As lipases podem ser obtidas a partir de diferentes fontes como células vegetais, microbianas ou animais (SALIHU; ALAM, 2015; BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

Quanto à aplicação industrial, além da sua propriedade catalítica, as lipases apresentam as seguintes vantagens: elevada especificidade, estabilidade em solventes orgânicos, atuam em condições amenas de temperatura, pressão e pH, não necessitam de cofatores (TREVISAN, 2014; ANDUALEMA; GESSESSE, 2012). A especificidade das lipases pode ser dividida em 3 grupos (KAPOOR; GUPTA, 2012; CASTRO *et al.*, 2004):

- Regiosseletivas: podem distinguir grupos funcionais os quais estão quimicamente situados em diferentes regiões no mesmo substrato, sendo elas: lipases não-específicas, que hidrolisam ésteres de ácidos graxos primários ou secundários, liberando ácidos graxos de todas as posições e lipases 1,3-específicas, que hidrolisam apenas ésteres de ácidos graxos primários, isto é, na posição 1 ou 3.

- Quimiosseletivas: atuam especificamente ou preferencialmente em um tipo de substrato. Por exemplo, na hidrólise de ésteres de determinados ácidos graxos, em função de seu tamanho de cadeia ou insaturação.
- Enantiosseletivas: capacidade que algumas lipases possuem de discriminar os enantiomêros de uma mistura racêmica.

Figura 2 - Reações catalisadas por lipases.



Fonte: Modificado (Parques; Macedo, 2006).

A *Candida antarctica* é uma das lipases mais utilizadas em biocatálise, por apresentar elevada enantiosseletividade, elevada estabilidade térmica e é muito resistente a solventes orgânicos (TANASKOVIĆ *et al.*, 2017). Existem dois tipos principais: tipo A (CALA) e tipo B (CALB), sendo a CALB a mais empregada em reações de síntese (ARANA-PEÑA; LOKHA; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2019; ITABAIANA JR. *et al.*, 2013; GOTOR-FERNÁNDEZ; BRIEVA; GOTO, 2006), visto que é altamente ativa para a esterificação de ácidos graxos e alcoóis (LIMA *et al.*, 2019; UPPENBERG *et al.*, 1994).

Em geral, as lipases possuem conformação tipo “aberta-fechada” (ativo-inativo) a qual está relacionada com o pH, temperatura, tipo de solvente e substrato. Essa característica está diretamente relacionada ao seu mecanismo de atuação, denominado de Fenômeno da Ativação Interfacial.

No mecanismo de atuação das lipases, o seu sítio ativo estará totalmente isolado do meio reacional quando a “lid” (espécie de tampa formada por uma cadeia peptídica) estiver na sua conformação fechada, apresentando uma baixa atividade lipolítica (RODRIGUES *et al.*, 2019; GROCHULSKI *et al.*, 1993). Por outro lado, a conformação fechada pode se converter na forma

aberta pela interação da lipase com a interface lipídio/água, promovendo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, possibilitando a catálise enzimática (KHOABI *et al.*, 2014; MILED *et al.*, 2001; GROCHULSKI *et al.*, 1993).

Embora a atividade catalítica seja nitidamente aumentada na presença dessa interface (lipídio/água) para muitas lipases, esse fenômeno não é evidenciado para todas as lipases (CARVALHO, 2015; WONG; SCHOTZ, 2002).

3.3 Imobilização de enzimas

A imobilização é uma ferramenta interessante que proporciona algumas vantagens em relação às enzimas livres, como maior estabilidade térmica e resistência às variações de pH, facilidade de separação do meio reacional, além de possibilitarem a operação contínua do processo, permitindo um maior controle das variáveis do processo, visto que o biocatalisador é retido no interior do biorreator (ZHANG *et al.*, 2012).

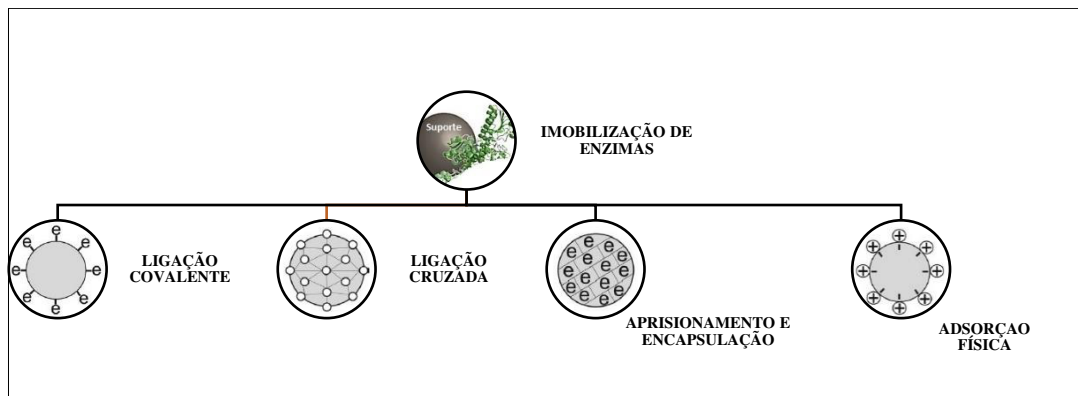
Para a escolha adequada do método de imobilização devem ser consideradas as condições do processo no qual o biocatalisador será aplicado, como por exemplo, o tipo de reação (hidrólise ou síntese), o meio reacional (aquoso ou orgânico), as condições reacionais, o tipo de substrato e do suporte e o custo da imobilização (KULKARNI, 2016). Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos para imobilização de enzimas, para cada aplicação é necessário escolher o procedimento mais simples e de menor custo, que resulte em uma enzima imobilizada com boa retenção de atividade e elevada estabilidade operacional (RODRIGUES, *et. al.*, 2019; CORTEZ *et al.*, 2018; FERNANDEZ-LOPEZ *et al.*, 2017).

Dependendo do método de imobilização empregado (Figura 3), a enzima pode ser imobilizada em um determinado suporte por encapsulamento ou ligação. Quando ocorrer por ligação, estas podem ser do tipo adsorção, cruzada e covalente (WEN-QIONG *et al.*, 2017; VESCOVI *et al.*, 2017; SHULER; KARGI, 2017; NAWONG *et al.*, 2016). A interação entre a enzima e o suporte promove uma imobilização com distintas propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A imobilização por adsorção em suportes hidrofóbicos é uma técnica considerada simples, pois envolve interações de superfície, na qual grupos superficiais do suporte interagem com grupos presentes na superfície da enzima, por meio de atrações eletrostáticas e forças de Van Der Waals. Devido ao seu baixo custo, fácil operação, condições brandas do processo (baixa força iônica e temperatura ambiente) e possibilidade de regeneração do suporte mediante a dessorção, apresenta-se como o método mais usual de imobilização (BENTO, 2015; ZHAO

et al., 2015; KAPOOR; GUPTA, 2012). Esse método de imobilização não requer uma forte interação enzima/suporte, devido à insolubilidade da enzima neste meio, caracterizando-se um método adequado para estabilizar lipases em matrizes de imobilização (BASSI *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016; ADLERCREUTZ, 2013).

Figura 3 - Representação dos principais processos de imobilização de enzimas em suportes sólidos.



Fonte: Modificado (Marques; Yamanaka, 2008).

Em linhas gerais a adsorção de lipases em suportes ocorre na superfície, dessa forma, parâmetros como tamanho da enzima, área superficial do suporte e principalmente o tamanho dos poros do material, influenciam fortemente a eficiência do método de imobilização. A porosidade é importante devido ao fato de que, além da enzima ligar-se à superfície do suporte, ela também se adsorverá no interior dos poros (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; ADLERCREUTZ, 2013; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

A técnica de imobilização por ligação covalente utiliza agentes de acoplamento que formam uma ligação química covalente entre a enzima e um suporte sólido. Existem diferentes agentes de acoplamento que podem ser usados, como glutaraldeído, ésteres de ácido carbodiimida, aldeídos reativos, epóxidos e anidridos de ácidos (POPPE *et al.*, 2015). Dentre as vantagens estão: a estabilidade aumentada da enzima (temperatura, pH e presença de inibidores), facilidade de recuperação e reutilização da enzima, reduzindo custos por ciclo de produção e possibilidade de usar condições reações mais extremas. No entanto, há desvantagens como perda parcial de atividade enzimática durante o processo de imobilização e limitação da difusão de substratos e produtos (MOHAMAD *et al.*, 2015; BARBOSA *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2011).

Outra abordagem é a ligação cruzada, também conhecida como cross-linking, que ocorre sem a necessidade de um suporte sólido. Nesse método, as proteínas são conectadas

entre si por meio da reação de reticulação entre um agente reticulante e diferentes preparações enzimáticas, tais como a enzima solubilizada. No entanto, é importante destacar algumas características desse método, pois, embora os aglomerados de enzimas formados por ligação cruzada sejam altamente estáveis em altas temperaturas e solventes orgânicos, os mesmos tendem a apresentar baixa estabilidade mecânica (CAO; SHELDON, 2003). Além disso, essa técnica geralmente resulta em baixa atividade recuperada das enzimas, podendo causar alterações significativas no sítio ativo das mesmas. Outro aspecto a ser considerado é que as interações entre as proteínas ocorrem de forma aleatória, o que resulta em baixa reprodutibilidade dos aglomerados obtidos (SHELDON, 2007).

A imobilização por aprisionamento/encapsulação é um método irreversível, em que através da incorporação da enzima na mistura reativa que será polimerizada, forma-se uma matriz polimérica que confina a enzima (KATO *et al.*, 2002). Esta técnica preserva a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando a inativação por solventes orgânicos e evita a perda de atividade devido à inativação ou distorção do sítio ativo (CAO *et al.*, 2016; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). No entanto, existem desafios relacionados ao controle do tamanho dos poros, a dessorção da enzima e as limitações na transferência de massa e difusão dos substratos. Além disso, muitos precursores utilizados na polimerização podem inativar as enzimas (SHELDON, 2007).

3.4 Suportes de imobilização

Diferentes materiais podem ser empregados como suporte para a imobilização enzimática, incluindo materiais inorgânicos, como sílica, zeólitas, alumina e hidroxiapatita, pois são geralmente estáveis termicamente e mecanicamente, não são tóxicos e são resistentes à presença de solventes orgânicos e a ataques microbianos. Matrizes poliméricas orgânicas naturais, como quitina, agarose, quitosana, gelatina, dextrana e celulose, e sintéticas, como poliacrilamida, poli(álcool vinílico), poliestireno, dentre outros, também podem ser utilizadas (MORAN *et al.*, 2018; ZAAK *et al.*, 2017; CAO *et al.*, 2016).

No desenvolvimento de bioprodutos para aplicação industrial, a maioria das enzimas imobilizadas e comercializadas é obtida a partir de matrizes orgânicas, provavelmente devido à grande variedade de grupos funcionais reativos que podem ser “introduzidos” em suportes orgânicos. Entretanto os suportes inorgânicos, devido às suas propriedades físicas, apresentam uma série de vantagens em relação aos suportes orgânicos como, por exemplo, elevada força

mecânica, estabilidade térmica, resistência a solventes orgânicos e ataque de micro-organismos e fácil regeneração por processo de pirólise. Portanto, os materiais utilizados como suportes para imobilização de enzimas devem ser selecionados baseados em uma série de critérios em relação às suas propriedades, aplicações e principalmente custo (DUTRA, 2019; MEI *et al.*, 2018; ROSENTHAL., 2018; ALTINKAYNAK; TAVLASOGLU; OCSOY, 2016).

Para sobrepor as vantagens dos suportes inorgânicos, o desenvolvimento de suportes orgânicos deve avaliar uma série de parâmetros, como área específica; porosidade; tamanho de partícula; a possibilidade de haver interações não específicas entre o substrato e o suporte; estabilidade química e mecânica; custo de produção; insolubilidade no meio reacional; resistência a contaminações microbianas; estabilidade térmica; diâmetro médio de poros adequado para permitir o acesso de enzimas e de substratos à área interna do suporte (no caso do emprego de suportes porosos); e natureza hidrofóbica/hidrofílica do suporte, o que está relacionado com o tipo da enzima (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; CASTRO *et al.*, 2008).

No caso específico das lipases, sabe-se que suportes hidrofóbicos são mais adequados, visto que, a "lid" da lipase (tampa hidrofóbica móvel) irá interagir com as porções hidrofóbicas do mesmo, apresentando-se em sua configuração aberta, expondo o sítio ativo da enzima para mediar a catálise (VILAS BÔAS *et al.*, 2018; QI *et al.*, 2018).

Materiais híbridos orgânico-inorgânicos vêm sendo cada vez mais desenvolvidos e estudados, uma vez que combinam as diferentes características desses materiais, contribuindo para a obtenção de um suporte com propriedades diferenciadas. Esses materiais podem ser facilmente preparados e modificados, apresentam grande possibilidade de combinações a partir dos componentes disponíveis, conferindo características específicas ao material produzido, como, propriedades mecânicas, controle da porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico, dependendo da aplicação desejada (XIANG *et al.*, 2018; MASTRIA *et al.*, 2015; PEREIRA, 2014). Materiais híbridos podem ser empregados na extração de cátions metálicos em soluções aquosas ou não aquosas, catálise, trocadores iônicos, cromatografia, uso industrial, entre outros (JUNIO; OLIVEIRA; PONZIO, 2015; OH *et al.*, 2011).

3.4.1 Polímeros

Macromoléculas constituídas por repetidas unidades químicas ao longo de uma cadeia química, ligadas covalentemente, são denominadas polímeros. O termo polímero tem origem na língua grega, sendo que “*polýs*” significa muito, e “*mero*” significa parte, fazendo referência às várias unidades de repetição. Quando o polímero apresenta a cadeia principal formada por

dois meros diferentes, ele é chamado copolímero (FAKIROV, 2017; KOLTZENBURG; MASKOS; NUYKEN, 2017; MANO; MENDES, 2004).

Podem ser de origem natural ou sintética: os naturais são encontrados na natureza como, proteínas, polissacarídeos, ácidos nucleicos, amido, látex e algodão. Os sintéticos são derivados de combustíveis fósseis, como o petróleo, tendo como exemplos, o poliestireno, polietileno, polipropileno, entre outros (RUDIN; CHOI, 2015). No âmbito dos polímeros sintéticos, existem diversas técnicas para síntese de acordo com os materiais de partida, sendo elas (CARRAHER JUNIOR, 2010; FRIED, 2003):

- Polimerização em Massa: Reação mais simples, contendo apenas monômero e iniciador (radicais livres). Apresenta como vantagem principal a qualidade do produto final, livre de qualquer impureza, porém possui difícil controle de temperatura durante a reação;
- Polimerização em Solução: Técnica que visa suprir a deficiência da técnica anterior, adicionando um líquido (solvente) ao meio para melhorar a transferência de calor e distribuição da temperatura;
- Polimerização em Emulsão: Nesta técnica um agente emulsificante é adicionado para manter o monômero disperso em água, formando micelas com extremidades hidrofóbicas viradas para dentro e hidrofílicas para fora. A polimerização ocorre dentro das micelas gerando um produto na forma de pó fino.
- Polimerização em Suspensão: Neste tipo de polimerização a água é utilizada como meio de dispersão de calor, substituindo o uso de solventes. A adição de um agente de suspensão é necessária para estabilizar a dispersão do monômero em pequenas gotas evitando a sua coalescência. O produto final da polimerização apresenta-se na forma de pérolas.

As principais vantagens da polimerização em suspensão são a alta dispersão de calor e a facilidade de recuperação do solvente em relação à polimerização em solução. Além disso, o produto sintetizado pode possuir características adequadas para algumas aplicações específicas, não necessitando de processamentos posteriores, como por exemplo, resinas de trocas iônicas e suportes para imobilização de enzimas (FRIED, 2014; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

Assim, esta técnica foi selecionada para sintetizar os copolímeros utilizados no presente trabalho, com base nos resultados previamente obtidos pelo grupo de Biocatálise da EEL-USP. A partir da polimerização em suspensão são obtidas pérolas de polímeros com certa

esfericidade, sendo adequado para a imobilização de lipases, possibilitando o melhor controle de algumas variáveis desejadas para esta aplicação, como área superficial específica, tamanho de partícula, diâmetro e volume de poros, além de ser uma técnica de fácil operação (ROSA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018a; BENTO *et al.*, 2017).

3.4.1.1 Suportes poliméricos

Inúmeros avanços vêm sendo realizados para o desenvolvimento de novos polímeros sintéticos, uma vez que são em geral de fácil preparação e apresentam usualmente baixo custo de obtenção. Além disso, algumas de suas características podem ser manipuladas, de forma a viabilizar a melhor interação entre a enzima e o suporte, como composição, porosidade, tamanho de partícula e funcionalidade na superfície desses materiais, possibilitando o estabelecimento e o controle dessas interações específicas (CANEVAROLO JR., 2010; BESTETI, 2009; KAHRAMAN *et al.*, 2007).

Na literatura são encontrados inúmeros trabalhos que descrevem o processo de imobilização em materiais orgânicos, inorgânicos e em materiais inorgânicos recobertos com componentes poliméricos, buscando obter biocatalisadores mais ativos e estáveis (LIU *et al.*, 2013; TAI *et al.*, 2012; SAY *et al.*, 2011). Uma variedade desses estudos emprega suportes poliméricos no processo de imobilização de enzimas, conforme mostra o Quadro 3.

Quadro 3 - Utilização de matrizes poliméricas como suporte para imobilização de lipases.

Lipase	Matriz	Objetivo	Referência
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Poli(etilenoimina) (PEI)	Obter a estabilidade e as propriedades catalíticas do biocatalisador	MAO <i>et al.</i> , 2022
<i>Candida rugosa</i>	Poli(metacrilato de metila)	Obter biolubrificantes à partir de subprodutos do processamento do óleo de soja	FERNANDES <i>et al.</i> , 2021
Pancreática suína	Terra diatomácea magnética (mDE) revestida com APTES (aminopropiltriétoxissilano)	Desenvolver um compósito biocompatível para imobilização de lipase	VAKILI <i>et al.</i> , 2020
<i>Rhizomucor miehei</i>	Matriz híbrida à base de quitosana	Avaliar as propriedades de matrizes híbridas à base de quitosana	CARNEIRO <i>et al.</i> , 2020
<i>Candida antarctica</i>	Resina de ácido gálico enxertada com nanopartículas magnéticas (MNPs)	Avaliar a imobilização da enzima no suporte desenvolvido	SREEHARSHA <i>et al.</i> , 2019
<i>Burkholderia cepacia</i>	Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	Sintetizar biodiesel a partir de óleo de soja e etanol	CASTIGLIONI <i>et al.</i> , 2016
<i>Candida rugosa</i>	Hidrogel de celulose / lignina	Avaliar o desempenho do biocatalisador na hidrólise do butirato de p-nitrofenilo	PARK <i>et al.</i> , 2015

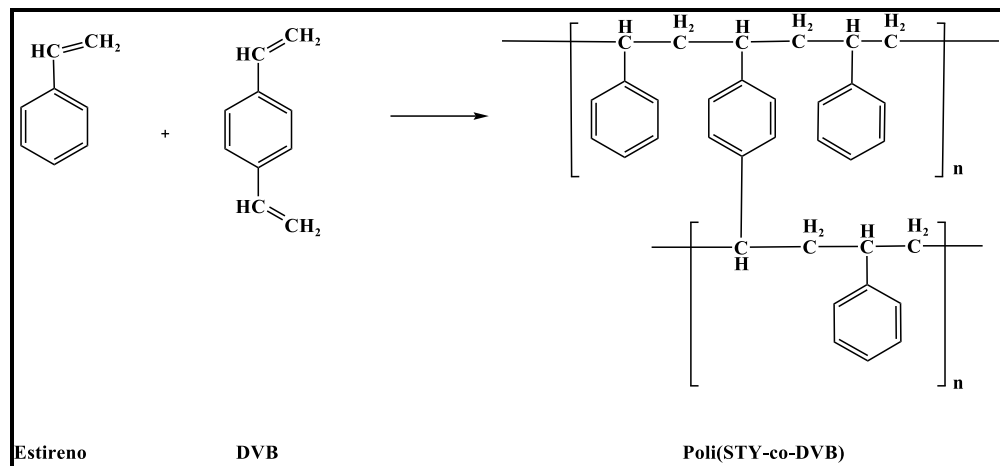
Fonte: Próprio autor.

Dentre as matrizes poliméricas sintéticas comerciais disponíveis, uma opção que apresenta grande potencial de utilização é o poli(estireno-co-divinilbenzeno), objeto de diversos estudos para imobilização de diferentes lipases e aplicações variadas (BENTO *et al.*, 2017; FAN *et al.*, 2014; IZQUIERDO *et al.*, 2014; DIZGE; KESKINLER, 2008; VILLENEUVE *et al.*, 2000; HATTORI; SUDOL; EL-AASSER, 1993).

O presente trabalho estudou a aplicabilidade de suportes à base de estireno modificados com diferentes agentes reticulantes, para imobilização da lipase CALB e mediação de síntese

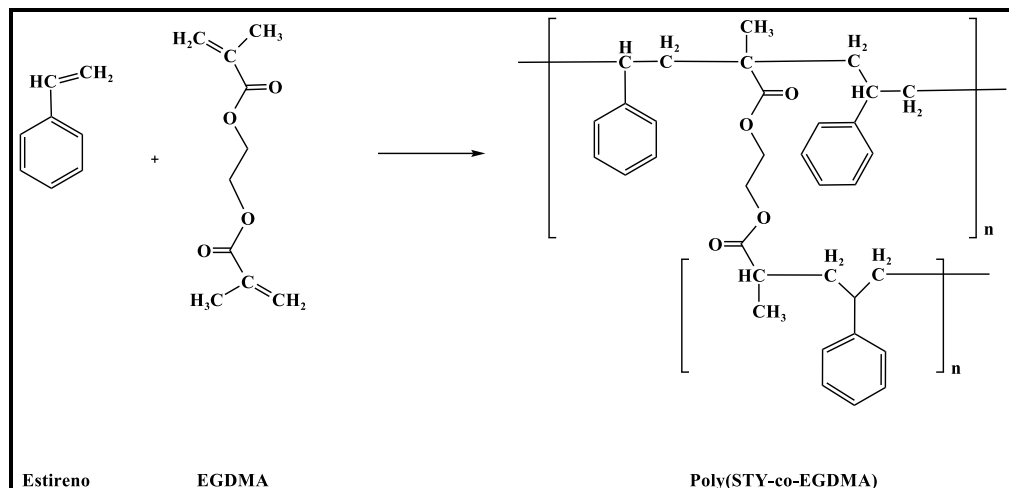
de ésteres emolientes, sendo eles: divinilbenzeno (DVB), etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA) e trietilenoglicol dimetacrilato (TEGDMA). A intenção em se utilizar diferentes reticulantes é que polímeros reticulados de formas distintas apresentam características específicas devido às alterações nas propriedades do material, como a polaridade, a porosidade e o grau de intumescimento (ROSA, 2019). As Figuras 4, 5 e 6 ilustram os esquemas representativos da formação dos copolímeros.

Figura 4 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-DVB.



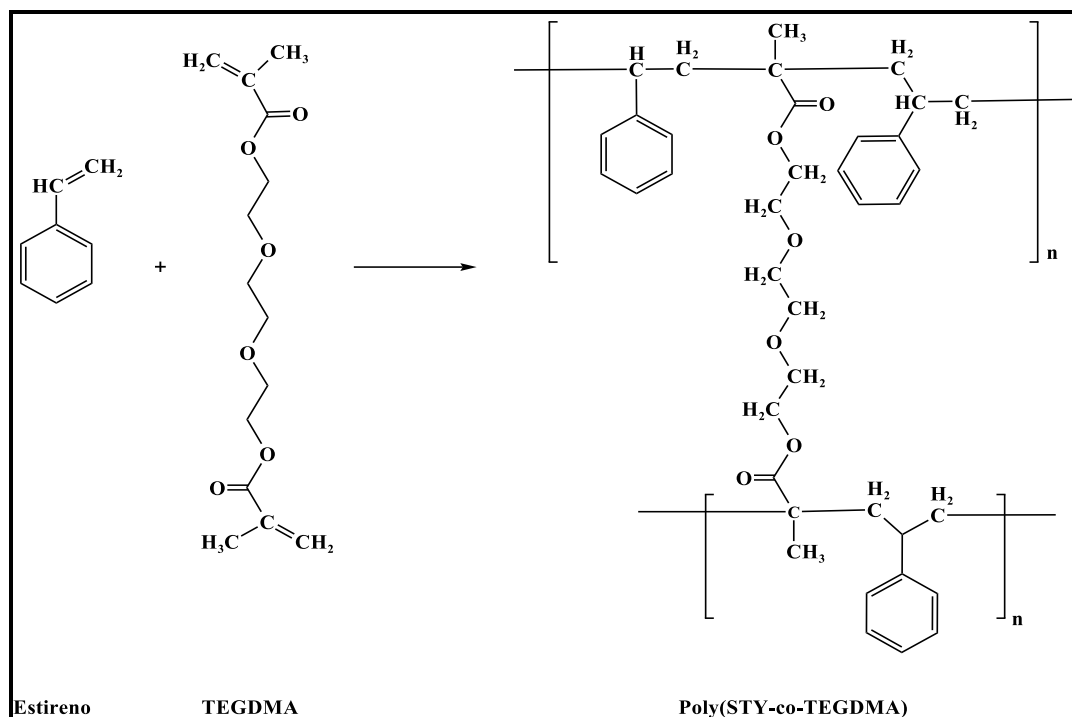
Fonte: BENTO, 2015.

Figura 5 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-EGDMA.



Fonte: ROSA, 2019.

Figura 6 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-TEGDMA.



Fonte: ROSA, 2019.

3.4.1.2 Polímeros magnetizados

A técnica de obtenção de copolímeros, por meio da co-precipitação de íons de ferro no processo de polimerização, tem sido um tema explorado pelo grupo de pesquisa de Biocatálise da EEL-USP. Essa abordagem tem demonstrado um desempenho promissor ao ser aplicada em matrizes magnetizadas para imobilização de lipases. Utilizando copolímeros magnetizados a base de estireno, sendo eles o poli(estireno-co-divinilbenzeno), poli(estireno-co-dimetacrilato de etilenoglicol) e poli(estireno-co-dimetacrilato de trietenoglicol). O grupo tem contribuído significativamente para avanços biotecnológicos, que incluem: caracterização física dos suportes de imobilização, aplicação dos derivados imobilizados na síntese de ésteres, aplicação de campo magnético em biorreatores e obtenção de modelos preditivos. O Quadro 4 disponibiliza um compilado dos trabalhos publicados.

Quadro 4 - Utilização de matrizes poliméricas magnetizadas como suporte para imobilização de lipases.

Lipase	Matriz	Tema	Referência
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	STY-EGDMA-M	Cinética e termodinâmica da síntese do oleato de octila	RANGEL <i>et al.</i> , 2022
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	STY-DVB-M	Cinética e termodinâmica da síntese do oleato de 2-etilhexila	DA SILVA <i>et al.</i> , 2021
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	STY-DVB-M	Síntese do oleato de 2-etilhexila em reator contínuo	DA SILVA <i>et al.</i> , 2020
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	STY-DVB-M STY-TEGDMA-M STY-EGDMA-M	Síntese e caracterização de copolímeros magnéticos à base de estireno	ROSA <i>et al.</i> , 2020
Lipase de <i>Penicillium camemberti</i>	STY-DVB-M	Síntese do palmitato de isopropila	SILVA <i>et al.</i> , 2020
Lipase de <i>Candida rugosa</i> e <i>Penicillium camemberti</i>	STY-DVB-M	Estudo cinético da síntese do palmitato de isopropila	SILVA <i>et al.</i> , 2020
Lipase B de <i>Candida antarctica</i>	STY-DVB-M	Síntese do oleato de 2-etilhexila em reator de leito fluidizado	SILVA <i>et al.</i> , 2020
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	STY-DVB-M	Síntese do miristato de isopropila	SILVA <i>et al.</i> , 2018a
Lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	STY-DVB-M	Otimização dos parâmetros de síntese do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como matriz de imobilização	SILVA <i>et al.</i> , 2018b
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	STY-DVB-M	Caracterização do copolímero poli(estireno-co-divinilbenzeno) como matriz de imobilização de enzimas	BENTO <i>et al.</i> , 2017

Fonte: Próprio autor.

No contexto da utilização de polímeros como matrizes de imobilização de enzimas, destaque vem sendo dado aos materiais híbridos constituídos por partículas magnéticas, compostas por óxidos de ferro (SILVA *et al.*, 2018b; SILVA, 2017; BENTO *et al.*, 2017;

BENTO, 2015). Esses compósitos são constituídos por cargas magnéticas (geralmente obtidas a partir da magnetita) incorporadas a uma matriz polimérica, e são atraentes do ponto de vista do desenvolvimento de novos materiais, principalmente devido à sua facilidade de recuperação do meio reacional (NEVES, *et al.*, 2011).

Partículas magnéticas são biocompatíveis, apresentam baixa toxicidade, elevada área específica e porosidade, o que facilita os mecanismos de transferência de massa, reduzindo possíveis efeitos de limitação difusional. Além disso, são de fácil recuperação do meio reacional (SILVA, 2017; MEHRASBI *et al.*, 2017; CIPOLATTI *et al.*, 2016). Em especial, a magnetita (Fe_3O_4) é um excelente material magnético entre os óxidos de ferro, contendo íons de Fe em dois estados de oxidação (Fe^{2+} e Fe^{3+}). Os íons Fe^{2+} são responsáveis pela magnetização de saturação e pelo comportamento magnético do material e os íons de Fe^{3+} impedem a existência de um momento magnético resultante destes íons (anulação das cargas) (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013).

Polímeros magnetizados apresentam vantagens para a imobilização de enzimas, podendo ser citadas: a) Elevada área superficial específica, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas; b) Baixa resistência à transferência de massa, fazendo com que as enzimas imobilizadas sejam mais estáveis e reativas; c) Facilidade de separação das partículas magnetizadas, devido a possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração; d) Possibilidade de uso/reuso em reatores enzimáticos, devido a facilidade de manuseio (VERMA; BARROW; PURI, 2013; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012).

3.5 Modelagem matemática

Para viabilizar a aplicabilidade de rotas enzimáticas na produção industrial, é preciso ampliar o entendimento sobre a maneira na qual as enzimas atuam na forma livre ou imobilizada sobre os seus substratos (JEOH *et al.*, 2017; PAYNE *et al.*, 2015; PERI *et al.*, 2007). Nesse sentido, a modelagem é uma ferramenta que pode contribuir decisivamente para esse entendimento, possibilitando a construção de modelos, mediante algumas hipóteses simplificadoras. Dessa forma, o modelo adquire uma estrutura definida a partir de dados teóricos e/ou experimentais, sendo possível determinar alguns parâmetros reacionais.

Em um modelo, a atribuição de uma relação entre variáveis obtidas pelos balanços do sistema e dos ajustes de seus parâmetros associados, gera novo conhecimento e possibilita

melhor compreensão do fenômeno que se pretende elucidar. Schwaab; Pinto (2007) destacam a necessidade da existência dos seguintes elementos característicos no processo de inferência paramétrica:

- Necessidade de um modelo de referência, que serve como uma tentativa de descrição (teórica ou empírica) do processo, dentro do qual será feita a inserção dos dados experimentais obtidos;
- Métrica, correspondendo a uma função objetivo que mede a distância dos dados previstos do modelo, com os experimentais;
- Consideração do erro experimental, que influencia o processo de estimação de parâmetros.

Dentre as características descritas por modelos matemáticos, as mais importantes são a cinética, termodinâmica, características enzimáticas, conformação e composição do substrato, inibições enzimáticas, limitações de transferência de massa, desativação de enzimas, dentre outras (PERI *et al.*, 2007). Essas variáveis podem ser estudadas e acompanhadas em laboratório, uma vez que, os testes em escala industrial são limitados a padrões de segurança e utilização de grande quantidade de insumos; sendo esse um dos objetivos da modelagem.

A partir da revisão bibliográfica notou-se que, modelos matemáticos capazes de reproduzir o comportamento cinético e termodinâmico de reações enzimáticas aplicadas à produção de ésteres emolientes, são limitados. Além disso, ressalta-se que dados referentes à copolímeros magnéticos que empregam agentes reticulantes diferentes do divinilbenzeno são escassos na literatura, o que torna o presente trabalho relevante, dando continuidade aos estudos nesta linha de pesquisa (ROSA *et al.*, 2020; BENTO *et al.*, 2017; SILVA, 2017).

3.5.1 Modelagem cinética de reações enzimáticas

A modelagem cinética de reações enzimáticas é uma ferramenta essencial para compreender e prever o comportamento das enzimas no processo de catálise. É baseada na aplicação de equações matemáticas que descrevem as taxas de reação e a interação entre os substratos e as enzimas, permitindo quantificar como a velocidade de uma reação enzimática varia em função das concentrações dos substratos, das constantes de velocidade e de outros

fatores que afetam a atividade enzimática como os inibidores (WANG *et al.*, 2020; ABIS *et al.*, 2019).

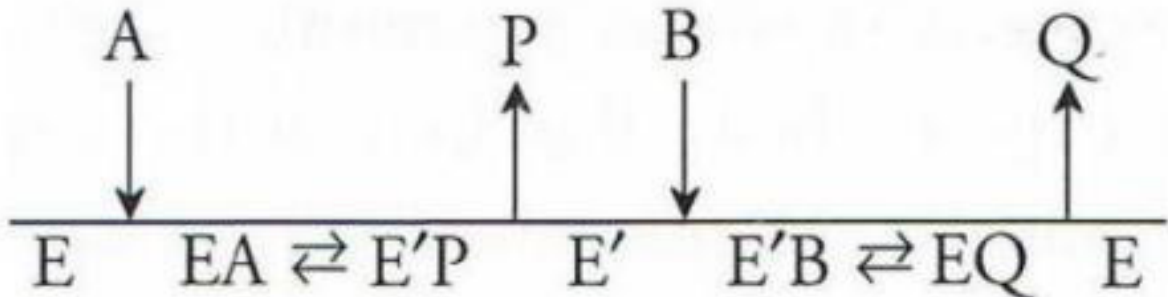
A literatura aponta que Michaelis e Menten (1913) desenvolveram um modelo de equação para reações enzimáticas, considerando apenas um substrato, que descreve a taxa de formação do complexo enzima-substrato e sua posterior conversão em produtos (MARANGONI, 2003). Os parâmetros das equações, como a constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima (V_{max}), são determinados experimentalmente e podem ser utilizados para ajustar os modelos cinéticos aos dados observados (STROBERG; SCHNELL, 2016).

Entretanto, como já exposto, o mecanismo das reações enzimáticas é consideravelmente mais complexo. Uma vez que, para além dos fatores físico-químicos como carga enzimática, pH e temperatura reacional, é apropriado considerar mais de um substrato e a inibição do álcool. Assim, o modelo denominado Ping-PongBi-Bi (Figura7) compreende em sua estrutura etapas fundamentais que consideram reagentes, produtos e espécies enzimáticas (SILVA *et al.*, 2020). As etapas consistem em (PRICE, 2014):

- I) O substrato A se liga ao sítio ativo da enzima, formando um complexo enzima-substrato (EA). Essa ligação ocorre com alta afinidade e especificidade.
- II) Após a formação do complexo EA, ocorre uma reação química que transforma o substrato A em um produto P. Essa conversão pode envolver diferentes tipos de reações, como hidrólise, oxidação ou transferência de grupos funcionais. A enzima atua como catalisador nesse processo, acelerando a reação.
- III) Após a conversão do substrato A em P, o produto P é liberado da enzima, deixando o sítio ativo disponível para a ligação de outro substrato. Nessa etapa, o substrato B se liga à enzima, formando um novo complexo enzima-substrato (E'P).
- IV) Assim como na etapa I, essa ligação ocorre com alta afinidade e especificidade.
- V) Após a formação do complexo E'B, ocorre uma reação química que converte o substrato B em um produto Q. Essa conversão é catalisada pela enzima e, após a reação, o produto Q é liberado da enzima. Esse produto final pode ser utilizado como

substrato por outras enzimas em reações subsequentes ou pode ser liberado como produto final da via metabólica.

Figura 7 - Mecanismo cinético de Ping-Pong Bi-Bi.



Em que: Na sequência de reação ordenada, a enzima (E) combina-se com o doador acila (A) para formar o complexo enzimático acila (EA). Após a formação do complexo EA, o primeiro produto, a água (P), é liberado. Em seguida, o segundo substrato álcool (B) é ligado para formar o complexo álcool enzimático acila (E'B). Posteriormente, o complexo E'B é dissociado em enzima livre (E) e produto (Q).

Fonte: PRICE, 2014.

Cavallaro, Tonetto e Ferreira (2019) estudaram a síntese enzimática do oleato de pentila, mediada por CALB imobilizada em um suporte estruturado de polietileno-alumínio, e obtiveram um modelo ajustado aos dados experimentais por meio de equações Ping-Pong Bi-Bi. Foi possível prever ou obter um modelo consistente com os dados experimentais ($R^2 = 0,982$), prevendo um aumento na produção do oleato de pentila mediante incremento da temperatura e uma redução na conversão quando empregadas maiores quantidades de ácido oleico (3:1). As condições experimentais variaram de 75-225 mg para a concentração de ácido oleico, temperatura de 25-65 °C e razão molar ácido:álcool entre 3:1 e 1:1. A otimização dos parâmetros permitiu determinar as melhores condições experimentais do bioprocesso: temperatura de 65 °C, razão molar 1:1 e concentração inicial de ácido 150 mg.

Silva *et al.* (2020) conduziram um estudo envolvendo a síntese enzimática do palmitato de isopropila, em que, foi desenvolvido um modelo cinético fundamentado no mecanismo Ping-Pong Bi-Bi empregando como biocatalisadores a lipase G e a lipase de *Candida rugosa* imobilizadas em suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno). Foram realizados experimentos nos quais variaram a razão molar entre os reagentes (ácido:álcool) e a proporção mássica do biocatalisador. Os resultados obtidos pelos autores revelaram predições satisfatórias através de ajustes de curva, com valores de $R^2 = 0,89$ quando se empregou a lipase

de *Candida rugosa* e $R^2= 0,92$ quando se utilizou a lipase G, como biocatalisadores do bioprocesso. Esses resultados demonstraram que os parâmetros cinéticos adotados no modelo proposto foram adequados e confiáveis para ambas as lipases estudadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Síntese dos suportes

Os suportes poliméricos magnetizados foram sintetizados a partir da técnica de polimerização em suspensão. O meio de polimerização dos suportes foi constituído de uma fase orgânica composta de estireno (Sigma-Aldrich[®]) e agentes reticulantes, sendo eles: divinilbenzeno – DVB (Sigma-Aldrich[®]), dimetacrilato de etilenoglicol – EGDMA (Sigma-Aldrich[®]) e dimetacrilato de trietilenoglicol – TEGDMA (Sigma-Aldrich[®]) e uma fase aquosa composta por solução de álcool polivinílico – PVA 88% hidrolisado – MM 78000 (Polysciences, Inc.). Na síntese do copolímero magnetizado foi utilizada magnetita obtida por co-precipitação a partir de cloreto de ferro (III) (Sigma-Aldrich[®] > 97%) e cloreto de ferro (II) tetra-hidratado (Sigma-Aldrich[®], 99%) em meio alcalino. Como solventes: heptano (Cromoline) e toluol (Cromoline), além do iniciador de radical azobisisobutironitrila – AIBN (MIG Química).

4.1.2 Imobilização da Enzima

Para o processo de imobilização da enzima, foram utilizados: polietilenoglicol - PEG MM 1500 (Synth), heptano 95% (Cromoline) e preparação comercial de lipase B de *Candida antarctica* (CalB), adquirida da Sigma-Aldrich[®].

4.1.3 Demais reagentes

Outros reagentes utilizados incluíram: ácido oleico P.S. 99% (Cromoline), butanol (Synth), álcool 2-etil-hexanol 99,5% (Cromoline), octanol (Synth), etanol anidro (Synth), acetona (Cromoline), hidróxido de sódio (Cromoline), hidróxido de potássio (Synth), ácido butírico (Vetec), sódio metálico (Merk) e cloreto de tionila 99,5% (Merk).

4.2 Equipamentos

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Principais equipamentos utilizados na realização do trabalho.

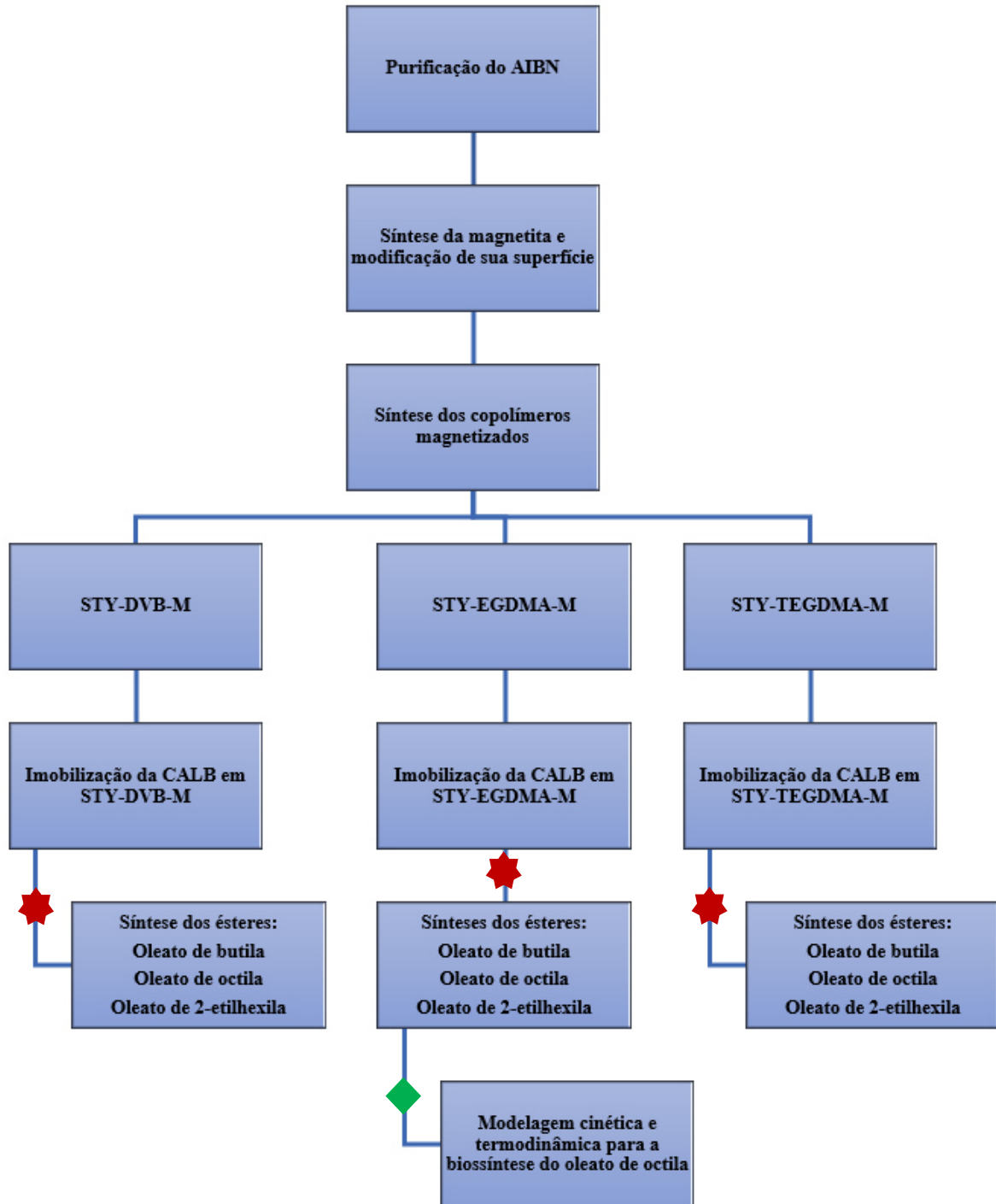
Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/Fabricante
Síntese da magnetita	Agitador Mecânico	RW20-Digital, IKA (IKA Laboratory Equipaments)
Medidas de pH	Potenciômetro	TEC2, Tecnal (TECNAL)
Polimerização	Reator de vidro encamisado (500 mL)	P.H.D (RFVCH0.5)
Teor de umidade	Balança analítica	(MOC63u - Shimadzu)
Classificação granulométrica	Agitador de peneiras	Sppencer (Série 11-05)
Reação de esterificação	Incubadora com agitação orbital	MA410 - Marconi
Dosagem de ésteres	Cromatógrafo de fase gasosa	Perkin Elmer (Modelo Clarus 580)

Fonte: Próprio autor.

4.3 Metodologia Experimental

Com o intuito de elucidar o trabalho que foi realizado são ilustradas na Figura 8 as principais etapas experimentais desenvolvidas, desde o preparo do biocatalisador até a síntese dos ésteres. Essas etapas serão descritas nos tópicos adiante, tomando como base as metodologias anteriormente estabelecidas nos trabalhos desenvolvidos pelo grupo de Biocatálise da EEL-USP.

Figura 8 - Etapas experimentais desenvolvidas.



★ A síntese dos ésteres foi conduzida sob diferentes temperaturas (35 – 55 °C).

◆ Os estudos cinéticos foram realizados para o bioprocesso que apresentou o melhor desempenho na síntese do éster emoliente.

Fonte: Próprio autor.

4.3.1 Purificação do AIBN

O iniciador das reações de polimerização (AIBN) foi purificado via recristalização. Em um erlenmeyer, 5 g de AIBN foram totalmente solubilizados em 100 mL de metanol sob agitação magnética e em seguida a solução foi mantida a 4 °C por 24 h. Os cristais foram filtrados e secos em dessecador utilizando sílica gel como agente desumidificante (ARMAREGO; CHAI, 2013, adaptado).

4.3.2 Síntese da Magnetita: Co-Precipitação dos íons Fe⁺² e Fe⁺³

Após o preparo das soluções, foram misturadas 60 mL de FeCl₂ (0,6 mol L⁻¹) com 60 mL de FeCl₃.4H₂O (1,2 mol L⁻¹) e adicionadas a um béquer com capacidade adequada, imerso em banho de glicerina, sob agitação mecânica. A temperatura do meio reacional foi estabilizada a 65 °C e 100 mL de solução aquosa de NaOH (4 mol L⁻¹) foram adicionadas lentamente ao meio, até que a solução atingisse pH 11,0.

A solução resultante, de coloração negra, foi mantida sob agitação durante 30 min a 65°C, seguida de repouso sobre um ímã para auxiliar a precipitação das partículas magnéticas. Os sólidos precipitados foram separados e lavados sucessivamente com água ultrapura (UP) e solução 1:1 de acetato de etila, até atingir pH 7,0. O fluido férrico contendo as partículas magnéticas foi filtrado à vácuo e levado à estufa a 60°C por 18 h (BENTO *et al.*, 2017).

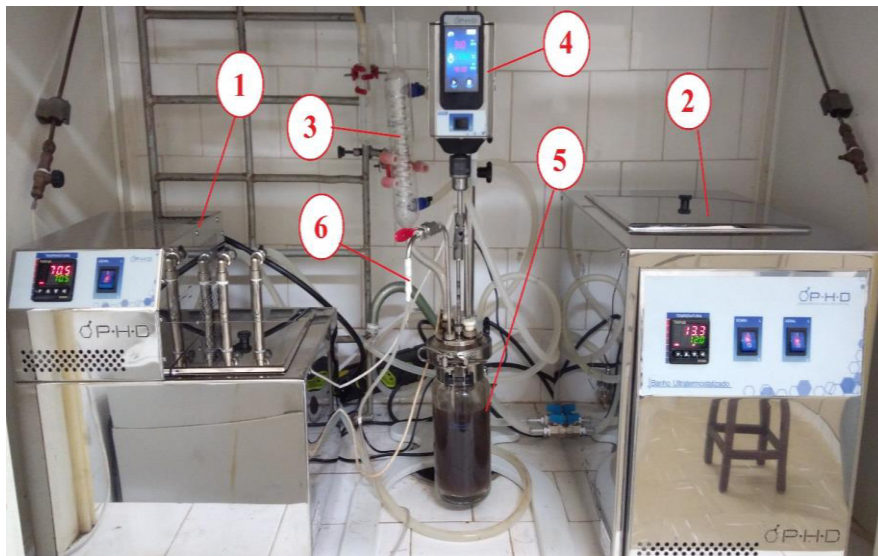
4.3.2.1 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico

A modificação da superfície da magnetita foi realizada empregando ácido oleico, conforme metodologia descrita por Bento *et al.* (2017), com o objetivo de aumentar sua hidrofobicidade. A massa de magnetita seca foi misturada sob agitação constante em ácido oleico, numa proporção de 3,25 g de magnetita: 40 mL de ácido oleico. Logo após, foram adicionados 80 mL de água e a mistura foi mantida sob agitação durante 30 min. A emulsão formada passou por filtração a vácuo e foi lavada com etanol para remover o ácido oleico residual. As partículas magnéticas modificadas foram levadas à estufa a 60 °C por 18 h para completa secagem, e então adicionadas à polimerização (BENTO *et al.*, 2017).

4.3.3 Síntese dos copolímeros magnéticos à base de estireno

Os copolímeros foram sintetizados a partir da técnica de polimerização em suspensão, em reator de vidro encamisado de 500 mL. A polimerização foi realizada empregando uma fase orgânica e uma fase aquosa (1:8 m/v), sendo a fase orgânica composta pelos monômeros de estireno e agente reticulante (DVB, EGDMA, TEGDMA), já a fase aquosa composta por 1% de PVA (m/v) dissolvido em 400 mL de água ultrapura, e o AIBN como iniciador na proporção de 1 % sobre a massa dos monômeros (m/m). A magnetita modificada foi adicionada na forma seca, 20% em relação à massa total de monômeros (m/m), para a magnetização dos copolímeros. Os reagentes adicionados foram mantidos à 70 °C por 6h sob agitação mecânica e atmosfera inerte de argônio (mantida durante as primeiras 2h de reação), como ilustrado na Figura 9.

Figura 9 - Aparato experimental utilizado para síntese dos suportes



Em que: 1 – Banho termostático para aquecimento do reator; 2 – Banho termostático para resfriamento do condensador; 3 – Condensador; 4 – Painel para controle da agitação do reator; 5 – Reator de vidro.

Fonte: Próprio autor.

Após a polimerização, o meio contendo as partículas poliméricas foi filtrado à vácuo e lavado com água UP à temperatura ambiente e aquecida a 50 °C, acetona e etanol (1:1 v/v), para remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Logo após, o material passou por secagem em estufa a 60 °C por 18 h e peneiração para classificação granulométrica.

As condições experimentais estão detalhadas na Tabela 1, onde foi variada a proporção mássica entre monômero e solvente para a síntese de cada copolímero magnetizado. É

importante destacar que o monômero é uma composição de estireno e agente reticulante, e o solvente composto por heptano e toluol, na qual suas proporções também foram variadas. As proporções relativas ao iniciador de radicais AIBN, agente de suspensão PVA e magnetita foram mantidas constantes em todas as reações de polimerização. Estes parâmetros foram baseados em trabalhos desenvolvidos previamente pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biocatálise da EEL-USP (ROSA, 2019).

Tabela 1 - Proporções mássicas utilizadas nas reações de polimerização para obtenção de cada copolímero magnetizado.

Copolímero magnetizado	Proporção mássica (%)			
	Monômero 40%		Solvente 60%	
STY-DVB-M	Estireno	Reticulante	Heptano	Toluol
	55%	45%	40%	60%
STY-EGDMA-M	Monômero 30%		Solvente 70%	
	Estireno	Reticulante	Heptano	Toluol
	70%	30%	60%	40%
STY-TEGDMA-M	Monômero 30%		Solvente 70%	
	Estireno	Reticulante	Heptano	Toluol
	55%	45%	50%	50%

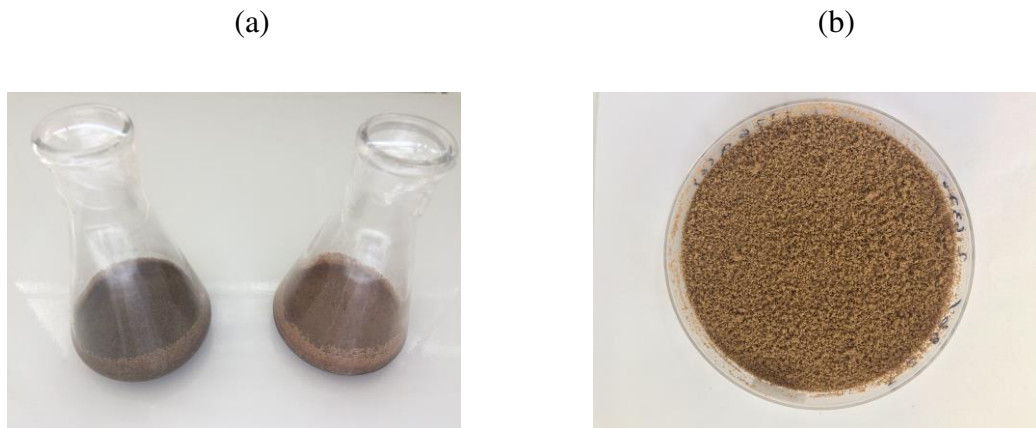
Fonte: Próprio autor.

4.3.4 Imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CalB) em suporte polimérico

O método selecionado para a imobilização da lipase, no presente trabalho, foi o de adsorção física. Os copolímeros obtidos foram embebidos em heptano (Figura 10a) na proporção de 1:10 (m/v) e mantidos sob agitação durante 2h em *shaker*. Em seguida foram adicionados 100 μ L de solução aquosa 5 g L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG-1500) e 0,25 g de lipase, para cada 1 g de suporte. Os sistemas foram mantidos sob agitação branda à temperatura ambiente por 2 h, seguido de contato estático por um período adicional de 18 h a 4 °C. A recuperação dos derivados imobilizados (Figura 10b) foi efetuada via filtração à vácuo, com

lavagens sucessivas com heptano até a redução da umidade dos biocatalisadores inferiores a 10 % (BENTO, 2015, p. 36, adaptado).

Figura 10 - Imobilização da lipase nos copolímeros magnetizados: (a) Copolímeros embebidos em heptano; (b) Derivado imobilizado obtido após etapa de secagem.



Fonte: Próprio autor.

4.3.5 Síntese dos ésteres emolientes oleato de butila, oleato de 2-etilhexila e oleato de octila conduzida em frascos agitados

Inicialmente, avaliou-se a influência da razão molar entre os materiais de partida (ácido e álcool), variando as seguintes proporções: equimolar, excesso de ácido graxo e excesso de álcool. Após determinar a proporção estequiométrica como a mais adequada, a mesma foi mantida constante durante a síntese dos ésteres.

Os ésteres emolientes foram sintetizados a partir da reação de esterificação do ácido oleico e dos alcoóis butanol, 2-etil-hexanol e octanol, catalisada pela lipase B de *Candida antarctica* (CalB) imobilizada nos diferentes suportes poliméricos, sendo eles: STY-DVB-M, STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M.

As reações de esterificação foram conduzidas em meio isento de solvente, em frascos fechados de vidro com capacidade total de 100 mL, empregando 20 mL de substrato com razão molar (ácido/álcool) de 1:1 e 10% (m/v) de biocatalisador em relação ao volume de substrato, conforme ilustra a Figura 11 (SILVA, 2017, p. 62, adaptado).

O sistema experimental foi conduzido em *shaker* sob agitação de 150 rpm por um período de 24 h à diferentes temperaturas (35 – 55 °C). Alíquotas foram retiradas em tempos pré-determinados e analisadas em função do consumo do ácido graxo por titulometria e por cromatografia em fase gasosa.

Figura 11 - Frasco utilizado para a realização das reações de esterificação*.



*A foto ilustra o procedimento para a coleta de amostra, sendo o biocatalisador precipitado sob ação de um ímã.

Fonte: Próprio autor.

4.4 Métodos de Análise

4.4.1 Classificação granulométrica

Para a classificação granulométrica das partículas dos suportes obtidos, foi utilizado um agitador de peneiras eletromagnético Spencer (Série 11-05), empregando o conjunto de peneiras de aço inox: 80, 42, 35 e 24 mesh tyler de abertura. O material retido pelas peneiras de 80, 42 e 35 mesh tyler foi utilizado como suporte para imobilização.

4.4.2 Teor de umidade

A determinação do teor de umidade do AIBN e dos biocatalisadores foi realizada em balança analítica acoplada com infravermelho durante 3 min a 105 °C.

4.4.3 Atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi quantificada pelo método da hidrólise do butirato de metila (FIDALGO *et al.*, 2016), de acordo com a Equação 1. A reação de hidrólise foi realizada em solução-tampão fosfato 0,025 mol.L⁻¹ (pH 7,0), sob agitação de

150 rpm em *shaker* a 37 °C. Após 10 min de reação, a mistura foi titulada com solução de KOH 0,02 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador.

$$\text{Atividade (U g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) * C * 1000}{t * m} \quad (1)$$

Em que: V_a = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL); C = Concentração da solução aquosa de KOH utilizada na titulação (mol L⁻¹); t = tempo da reação em minutos; m = massa de biocatalisador (g).

4.4.4 Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização (η%) foi calculado empregando-se a Equação 2 (BENTO, 2015).

$$\eta(\%) = \frac{U_s}{U_0} \times 100 \quad (2)$$

Em que: U_s = unidades de atividade enzimática total presentes no derivado imobilizado (massa seca do derivado imobilizado × atividade); U₀ = unidades de atividade oferecidas para imobilização.

4.4.5 Acompanhamento das reações de esterificação

O consumo do ácido graxo na reação de esterificação foi acompanhado por titulação com solução aquosa de KOH (0,04 mol L⁻¹) e fenolftaleína como indicador, sendo adicionadas 10 mL de etanol à cada alíquota de 0,5 g do meio reacional. O acompanhamento da síntese foi expresso em termos de consumo do ácido graxo (Equação 3) e sua conversão (Equação 4).

$$\text{Ácido carboxílico (g/L)} = \frac{V * M * MM}{v} \times 100 \quad (3)$$

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).

$$\text{Conversão(\%)} = \frac{(C_i - C_t)}{C_i} \times 100 \quad (4)$$

Em que: C_i = Concentração inicial do ácido no substrato ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) e C_t = Concentração do ácido em tempo determinado da reação de esterificação ($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$).

Destaca-se que foi realizado o “controle” das reações de esterificação através da coleta de amostras em intervalos de tempo pré-definidos ao longo de um período de 24 horas, nas quais foram conduzidas com o substrato e suporte, verificando-se por meio da titulação que não ocorria o consumo do ácido. Assim, constatou-se que o ácido não era absorvido pelos suportes utilizados na imobilização da lipase.

4.4.5.1 – Estabelecimento do método cromatográfico para quantificação do oleato de octila

A formação do éster oleato de octila foi quantificada por cromatografia em fase gasosa, em um cromatógrafo gasoso PerkinElmer® - Modelo Clarus 580, equipado com uma coluna capilar com recheio composto de 5% difenilo e 95% dimetilpolisiloxano, revestida por fibra de vidro e detector de ionização de chama (FID).

Para esta finalidade, inicialmente foi sintetizado o padrão do oleato de octila, utilizando ácido oléico, octanol, sódio metálico (Na) e cloreto de tionila (SOCl_2), de acordo com metodologia adaptada de Da Silva (2017). A purificação do oleato de octila foi realizada por destilação à vácuo (2 mmHg), sendo primeiramente retirada a fração que continha o octanol e posteriormente a fração contendo o éster emoliente, sendo esta destilada a temperatura de 225 °C. A formação do éster foi constatada por cromatografia em camada delgada.

A Tabela 2 apresenta as condições de operação para implementação do método de análise para o éster oleato de octila. Os fluxos dos gases para alimentação do detector foram mantidos em 40 e 400 mL min^{-1} de H_2 e ar sintético, respectivamente, sendo N_2 utilizado como gás de arraste (variação de fluxo entre 0,2 a 1 mL min^{-1}). As temperaturas de injetor e detector foram de, respectivamente, 200°C e 250°C. O volume de injeção foi de 1 μL de uma mistura 1:1 da amostra com o padrão interno (8,0 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de hexanol em heptano) e o tempo total de análise foi de 22,25 min.

Tabela 2 - Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do oleato de octila.

Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°Cmin ⁻¹)	Tempo (min)	Vazão do gás de arraste (mLmin ⁻¹)
105	-	7	0,2
105-130	20	-	1,0
130	-	1	1,0
130-200	25	-	1,0
200	-	2	1,0
200-280	25	-	1,0
280	-	5	1,0

Fonte: Próprio autor.

4.4.6 Determinação dos parâmetros cinéticos do bioprocesso

A obtenção do modelo cinético enzimático para a síntese do éster oleato de octila empregando o biocatalisador CALB-STY-EGDMA-M em diferentes temperaturas (35–55 °C) foi construído de acordo com estudos realizados por Silva *et al.* (2020) e Lopresto *et al.* (2014) utilizando o software Scilab 6.1. Aplicando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi em uma reação de esterificação foi possível encontrar o melhor ajuste para o modelo, manipulando-se diferentes parâmetros para as condições operacionais do bioprocesso. A Equação 5 apresenta a equação da taxa da reação global (r).

$$r = \frac{V_{\max}^f V_{\max}^r C_{Ac} C_{Al} - \frac{C_{Es} C_W}{K_{eq}}}{\left[V_{\max}^r K_{iAc} K_{mAl} \left(1 + \frac{C_{Al}}{K'_{iAl}} \right) + V_{\max}^r K_{mAl} C_{Ac} \left(1 + \frac{C_{Ac}}{K'_{iAc}} \right) + V_{\max}^r K_{mAc} C_{Al} \left(1 + \frac{C_{Al}}{K'_{iAl}} \right) + \frac{V_{\max}^f K_{mW} C_{Es}}{K_{eq}} + \frac{V_{\max}^f K_{mEs} C_W}{K_{eq}} + V_{\max}^f C_{Ac} C_{Al} + \frac{V_{\max}^f K_{mW} C_{Ac} C_{Es}}{K_{eq} K_{iAc}} + \frac{V_{\max}^r C_{Es} C_W}{K_{eq}} + \frac{V_{\max}^r K_{mAc} C_{Al} C_W}{K_{iW}} + \frac{V_{\max}^r C_{Ac} C_{Al} C_{Es}}{K_{iEs}} + \frac{V_{\max}^f C_{Al} C_{Es} C_W}{K_{iAl} K_{eq}} \right]} \quad (5)$$

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 do ácido, C_{Al} é a concentração do álcool, C_{Es} é a concentração do éster, C_W é a concentração 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 Menten* para o ácido, K_{mAl} é a constante de *Michaelis Menten* 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 Menten* da água, K_{mEs} é a constante de *Michaelis Menten* do éster, K_{iW} é a constante de inibição da água e K_{iEs} é a constante da inibição do éster.

Para a obtenção dos melhores ajustes dos parâmetros foi aplicado o critério de informação de Akaike, a partir dos somatórios dos mínimos quadrados, assim como descrito por Nogueira *et al.* (2020). O critério de informação de Akaike é uma forma de mensurar a qualidade do modelo criado, entretanto, seu valor isolado não possui significado substancial. Esse critério viabiliza a comparação entre dois ou mais modelos, permitindo identificar aquele que apresenta o menor valor, indicando assim, uma maior concordância com os dados observados (GUSTAVO; SZEKELY; TOTH, 2020).

Assim, o presente estudo adotou o Critério de Akaike para a obtenção do somatório dos quadrados dos resíduos entre os pontos experimentais e os do modelo adotado, encontrando-se a melhor combinação dos ajustes. Os valores obtidos no somatório dos erros foram aplicados a Equação 6 e posteriormente a Equação 7, que representa o critério de Akaike corrigido.

$$AIC = N \ln \left(\frac{SSE}{N} \right) + 2K \quad (6)$$

$$AIC_C = AIC + \frac{2K(K+1)}{N-K-1} \quad (7)$$

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.

Além disso, também foram utilizadas para a construção do modelo cinético, as Equação de *Van'tHoff* (Equação 8) para a obtenção das entalpias da reação e a Equação de *Arrhenius* (Equação 9) para encontrar K_{eq} , K_{iES} , K_{iW} , v_{max}^f e v_{max}^r do bioprocessamento.

$$\ln K = -\frac{\Delta H}{R} * \frac{1}{T} + \frac{\Delta S}{R} \quad (8)$$

$$\ln K = \frac{E_a}{R} * \frac{1}{T} + \ln A \quad (9)$$

Em que: ΔH é a variação de entalpia, ΔS é a variação de entropia, E_a é a energia de ativação, T é a temperatura absoluta e R a constante universal dos gases.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Características do suporte e dos biocatalisadores desenvolvidos

Os biocatalisadores foram obtidos a partir da imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em diferentes suportes poliméricos: STY-DVB-M, STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M. A atividade hidrolítica obtida a partir do butirato de metila, rendimento de imobilização e a umidade dos mesmos estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade enzimática, rendimento de imobilização e umidade dos biocatalisadores desenvolvidos.

Biocatalisador	Rendimento de Imobilização (%)	Umidade (%)	Atividade Hidrolítica (U g ⁻¹)
CALB-STY-DVB-M	83,17	< 10%	522,97 ± 19,14
CALB-STY-EGDMA-M	76,18	< 10%	810,81 ± 14,18
CALB-STY-TEGDMA-M	89,40	< 10%	618,47 ± 15,73

Fonte: Próprio autor.

Siódmiak *et al.* (2020) conduziram um estudo abrangente sobre a imobilização da lipase CALB em 12 diferentes suportes, incluindo 4 matrizes semelhantes às utilizadas neste trabalho. Fatores como natureza da matriz, tipo de ligação, grupo funcional e tamanho de partícula foram considerados para avaliar o desempenho da lipase. A máxima atividade hidrolítica atingida foi de 720,00 U g⁻¹, e ao comparar a atividade obtida no presente trabalho (Tabela 3), constata-se a eficiência da matriz polimérica utilizada para a imobilização das lipases, bem como sua aplicação como biocatalisador.

Rosa (2019) abordou o estudo da síntese e caracterização de partículas poliméricas à base de estireno magnetizadas por co-precipitação de íons Fe²⁺ e Fe³⁺, em meio alcalino, para serem utilizadas como suporte de imobilização de enzimas. Os copolímeros foram caracterizados por diferentes análises que revelaram a influência do tipo do agente reticulante nas características dos copolímeros. A Tabela 4 resume os principais resultados obtidos por Rosa (2019) e os valores de log P dos agentes reticulantes empregados.

Tabela 4 - Propriedades físicas dos copolímeros magnetizados.

Análise	Objetivo	STY-DVB-M	STY-EGDMA-M	STY-TEGDMA-M
BET	Área superficial (m ² /g)			
	Diâmetro médio de poros (nm)	437	114	44
	Volume médio de poros (cm ³ /g)	5,9	8,8	13,8
		0,64	0,25	0,15
Análise termogravimétrica	Temperatura (°C) de início de decomposição térmica	417,6	369,3	341,1
Grau de intumescimento	Grau de absorção pelas partículas poliméricas (%)	2,51	5,16	3,58
log P*	Caráter hidrofílico/hidrofóbico dos reticulantes	2,72	2,40	1,88

*Log P está relacionado ao valor do coeficiente de partição de um solvente orgânico em uma fase aquosa.

Fonte: Rosa (2019).

Conforme a Tabela 4, o suporte que apresentou o maior grau de intumescimento foi o STY-EGDMA-M (5,16%) e de acordo com a Tabela 3, esse mesmo copolímero quando imobilizado com a lipase CALB foi o que demonstrou a maior atividade hidrolítica ($810,81 \pm 14,18 \text{ U g}^{-1}$). Sabe-se que o grau de intumescimento revela a capacidade das partículas poliméricas em absorver um solvente específico.

Assim, esta observação deve estar relacionada ao fato do STY-EGDMA-M possuir uma maior capacidade de absorção do solvente heptano durante o processo de imobilização, visto que intumescer mais que os demais suportes testados, possivelmente devido ao maior grau de reticulação desta matriz (ROSA, 2019; SANTOS, 2015; OKAY, 2000). Essa constatação sugere que a matriz STY-EGDMA-M pode oferecer condições mais favoráveis para a imobilização por adsorção física da lipase, o que pode influenciar positivamente na atividade catalítica desse biocatalisador.

Os demais resultados exibidos na Tabela 4 serão abordados nos tópicos subsequentes, a fim de embasar discussões e permitir compreender a influência da matriz polimérica na biossíntese de ésteres emolientes.

5.2 Síntese enzimática dos ésteres emolientes

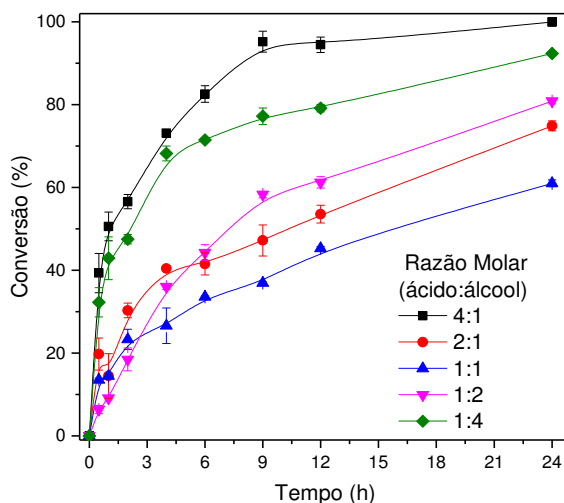
Visando obter ésteres emolientes (KHAN; RHATOD, 2015), a biossíntese ocorreu a partir da esterificação do ácido oleico com três diferentes álcoois (2-etilhexanol, butila e octila), em meio isento de solvente, empregando a lipase CALB imobilizada nos três diferentes suportes poliméricos: STY-DVB-M, STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M. Assim, coube estabelecer condições experimentais que permitiam avaliar o melhor desempenho das reações, considerando algumas das principais variáveis que influenciam o processo, como: razão molar (ácido:álcool) e temperatura.

5.2.1 Influência da razão molar

A influência da razão molar entre os materiais de partida foi avaliada na síntese do oleato de 2-etilhexila catalisada pela lipase CALB imobilizada em STY-DVB-M. Esse sistema reacional foi selecionado para esta análise por empregar um copolímero amplamente estudado na literatura (BARSÉ *et al.*, 2018; CASTIGLIONI *et al.*, 2016; MARTINS *et al.*, 2013) e por apresentar características bem estabelecidas, obtidas inclusive pelo nosso grupo de pesquisa em trabalhos realizados previamente (DA SILVA *et al.*, 2021; ROSA *et al.*, 2020; SILVA *et al.*, 2018b; BENTO *et al.*, 2017) e pelo éster apresentar características apropriadas para a aplicação como emoliente.

As reações de esterificação foram realizadas nas seguintes razões molares ácido/álcool: equimolar (1:1), excesso de ácido oleico (2:1 e 4:1) e álcool 2-etilhexanol (1:2 e 1:4). Como pode ser observado na Figura 12, ocorreu consumo do ácido graxo em todas as condições testadas, demonstrando a eficácia do biocatalisador empregado para mediar a catálise da reação.

Figura 12 - Perfil da conversão do ácido oleico na reação de esterificação para a síntese do oleato de 2-etilhexila empregando diferentes razões molares, catalisada por CALB-STY-DVB-M (10% m/v de biocatalisador, sob 50 °C e agitação de 150 rpm).



Fonte: Próprio autor.

Verifica-se que nesse conjunto de experimentos, as conversões variaram de 60 a 100% (aproximadamente) em 24 h, entretanto, os testes que empregaram excesso de um dos reagentes forneceram os melhores resultados de conversão do ácido oleico. Esta observação pode ser explicada pelo princípio de Le Châtelier, pois o aumento da concentração de um dos reagentes desloca o equilíbrio da reação para o sentido de formação de produtos, elevando a conversão (DA SILVA *et al.*, 2020).

De acordo com a Figura 12, o teste que empregou razão molar (ácido/álcool) 4:1 foi o que apresentou o melhor desempenho na conversão da reação, atingindo 95% em apenas 9 horas. Esse resultado pode ser explicado pelo excesso de ácido favorecer a formação do complexo enzima-grupo acila para posterior reação com o álcool, conduzindo assim a formação do éster, e reduzindo a competição entre os aceptores, parâmetro essencial para a cinética de uma reação de esterificação (STERGIOU *et al.*, 2013; VILAS BÔAS *et al.*, 2017).

No entanto, como pode ser observado na Tabela 5, o experimento na qual empregou razão molar estequiométrica (1:1), foi o que apresentou a maior concentração (473,98 g L⁻¹) e produtividade em oleato de 2-etilhexila (0,50 mmol g⁻¹ h⁻¹), e que, quanto maior o excesso de um dos reagentes, tanto do ácido quanto do álcool, menor o valor desses parâmetros obtidos. Esta observação pode ser justificada pela diluição do produto formado no reagente em excesso no meio reacional, principalmente quando o excesso é do ácido oleico, devido sua elevada

massa molar ($MM = 282,47 \text{ g mol}^{-1}$), apresentando produtividades inferiores a $0,20 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Tabela 5 - Concentrações e produtividades em éster obtida nos diferentes sistemas reacionais em 24 h de reação.

Razão molar (ácido/álcool)	Concentração (g L^{-1})	Produtividade ($\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$)
4:1	272,12	0,20
2:1	357,50	0,38
1:1	473,98	0,50
1:2	449,14	0,47
1:4	376,36	0,40

Fonte: Próprio autor.

Esses resultados são similares aos reportados por Da Silva *et al.* (2020) referente a síntese do oleato de 2-etilhexila, por meio da esterificação do ácido oleico com 2-etil-hexanol, conduzida em biorreator de leito fixo utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador a $50 \text{ }^\circ\text{C}$ para 12 h de tempo espacial. Os autores observaram que ao variar a razão molar (ácido/álcool) de 4:1 para 1:1, a produtividade em éster do bioprocesso aumentou de $0,127$ para $0,278 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ e a concentração de $338,16$ para $471,65 \text{ g L}^{-1}$.

Sendo assim, a proporção estequiométrica entre os reagentes foi selecionada como a condição mais atrativa para a síntese do éster emoliente, do ponto de vista econômico, devido à obtenção de maior produtividade em éster (FIGUEIREDO; SALIM; BORGEM, 2010; DA SILVA *et al.*, 2020).

Desta forma, os estudos subsequentes para avaliar a influência da temperatura na síntese dos ésteres emolientes, para os 3 biocatalisadores obtidos, foram realizados na razão equimolar ácido:álcool. Adicionalmente, a modelagem cinética e os parâmetros termodinâmicos foram obtidos para o bioprocesso mais vantajoso.

5.2.2 Influência da temperatura

Uma vez estabelecida a razão molar adequada para o bioprocessos, foi avaliada a influência de outra variável que também afeta o desempenho de um bioprocessos, a temperatura. Assim, novos experimentos foram conduzidos em batelada empregando diferentes temperaturas, na faixa de temperatura de $35 - 55 \text{ }^\circ\text{C}$, sendo os demais parâmetros fixados. Sabe-se que o emprego de temperaturas mais elevadas diminui a viscosidade do substrato, facilitando

a conversão, no entanto, pode favorecer a desativação catalítica da enzima ao longo do tempo de exposição (VIDAL, 2016; SILVA et. al, 2012).

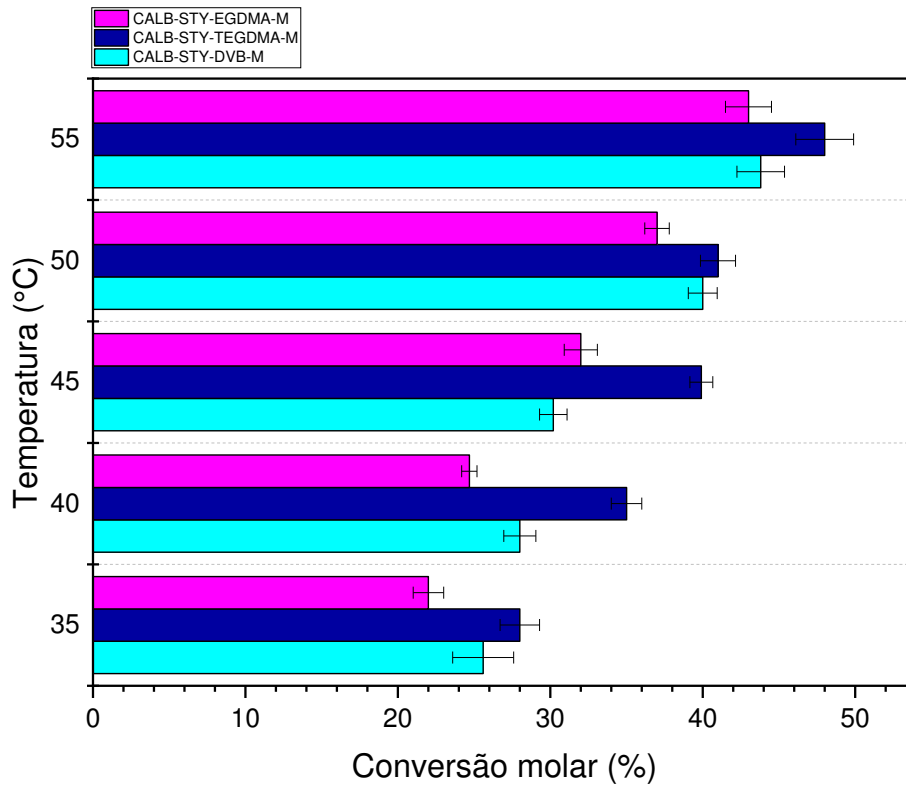
5.2.2.1 Síntese do oleato de butila

O oleato de butila foi obtido pela catálise da lipase CALB imobilizada nos três diferentes suportes poliméricos: STY-DVB-M, STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M, sendo a reação ocorrida a partir da transferência de um grupo alquila do álcool butílico para o grupo carboxila do ácido oleico, produzindo o éster. A polaridade do álcool empregado possui influência nas conversões atingidas, uma vez que a polaridade aumenta com a diminuição do tamanho da cadeia e a interação com o sítio ativo da enzima é menos favorável (ALMEIDA *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2017; BEZBRADICA *et al.*, 2007). Além disso, sabe-se que quando muito polares, os solventes e os substratos podem reduzir a camada de hidratação da enzima, desnaturando-a e diminuindo o seu poder de catálise (STERGIOU *et al.*, 2013).

Os dados experimentais da síntese do oleato de butila são apresentados na Figura 13, na qual demonstra as conversões máximas obtidas empregando os 3 biocatalisadores sintetizados, sob diferentes temperaturas.

Ao observar os dados expressos na Figura 13, independente do biocatalisador aplicado, não foi possível alcançar mais de 50% de conversão do ácido oleico. Esse fato pode estar relacionado à polaridade do meio, visto que, como foi mencionado anteriormente, um meio reacional mais polar, ocasionado aqui pelo álcool empregado, pode reduzir o poder catalítico da lipase.

Figura 13 - Influência do incremento da temperatura na conversão máxima do ácido oleico na reação de esterificação na síntese do oleato de butila empregando os biocatalisadores CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M.



* Faixa de temperatura reacional de 35 – 55°C em 24h de reação.

Fonte: Próprio autor.

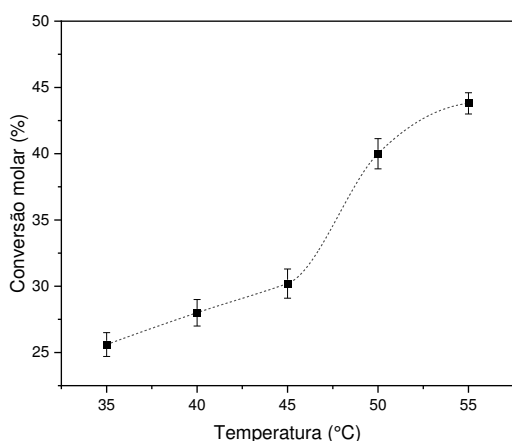
Ao comparar as sínteses catalisadas por CALB-STY-DVB-M e CALB-STY-EGDMA-M, nota-se que ambas possuem similaridade nas conversões alcançadas, atingindo aproximadamente 45% a 55°C (em 24h). Para o experimento que empregou CALB-STY-TEGDMA-M como biocatalisador, observa-se que foi atingida conversão aproximada de 50% a 55 °C em 24h. É importante destacar que, experimentalmente foi notada uma melhor dispersão entre o substrato e o biocatalisador, o que sugere a ocorrência de um possível aumento das colisões entre as moléculas de reagentes e a lipase, proporcionando uma cinética reacional que favorece a formação de produto.

A Figura 14 apresenta o perfil da conversão máxima alcançada empregando-se os 3 diferentes sistemas imobilizados na síntese do oleato de butila, porém sob a ótica da atuação do biocatalisador mediante o incremento da temperatura. Nesse quesito o desempenho dos três derivados imobilizados foi satisfatório, uma vez que não apresentou decréscimo de conversão

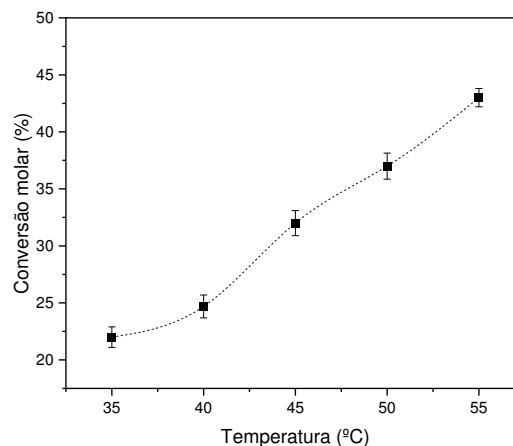
em nenhuma temperatura empregada, o que corrobora com a finalidade da imobilização de enzimas, que é a manutenção da atividade catalítica sob tempos prolongados e temperaturas mais elevadas, sendo uma das principais vantagens da técnica de imobilização (ROSA, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019; BENTO *et al.*, 2017).

Figura 14 - Influência do incremento de temperatura no desempenho dos biocatalisadores na síntese do oleato de butila: a) CALB-STY-DVB-M, b) CALB-STY-EGDMA-M e c) CALB-STY-TEGDMA-M.

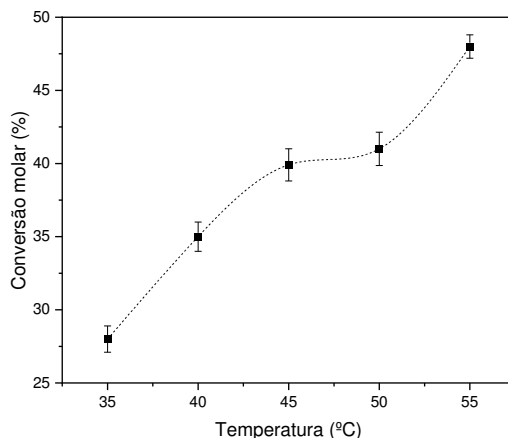
a)



b)



c)



Fonte: Próprio autor.

Outro ponto interessante é a questão do desempenho do tipo do biocatalisador empregado nesse meio reacional (ácido oleico + butanol), na qual é possível notar que as melhores conversões de reação foram obtidas empregando-se o CALB-STY-TEGDMA-M em todas as temperaturas. De acordo com a Tabela 4 o reticulante TEGDMA possui o menor valor de log P (1,88) entre os demais agentes reticulantes testados, conferindo-lhe maior característica

hidrofílica, o que proporciona maior interação do suporte com o meio reacional empregado (meio reacional mais polar testado no presente trabalho), resultando em maiores formações de produto. Esse fato corrobora com a observação descrita anteriormente sobre uma melhor dispersão entre o biocatalisador e o meio reacional.

5.2.2.2 Síntese do oleato de octila

A avaliação da síntese do oleato de octila em relação ao incremento da temperatura (35 – 55 °C) empregando os diferentes biocatalisadores sintetizados está apresentada na Figura 15, na qual mostra as máximas conversões do ácido oleico obtidas. Um fator importante a ser considerado é o tamanho da cadeia carbônica do octanol (C8) que é maior quando comparado ao butanol (C4), o que altera a polaridade do meio reacional, tornando-o mais apolar.

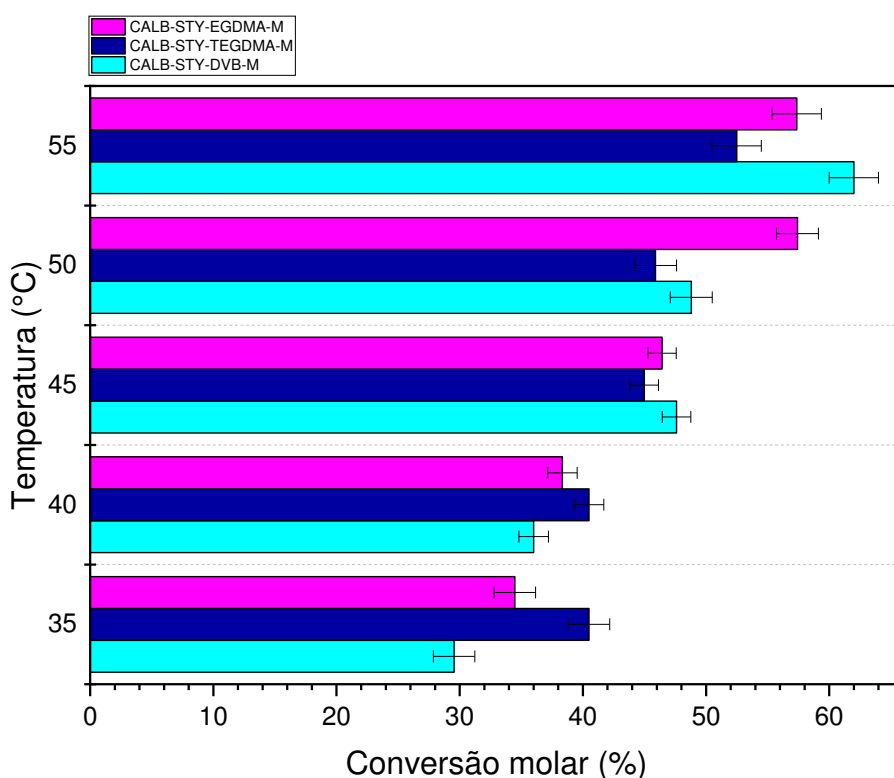
A atividade das lipases, em relação aos diferentes álcoois, segue uma ordem de preferência, na qual os álcoois primários são mais facilmente reconhecidos e catalisados por essas enzimas em comparação aos álcoois secundários e terciários (KAPOOR; GUPTA, 2012). Apesar do álcool butílico e octílico serem igualmente primários, evidenciou-se que o tamanho da cadeia carbônica influenciou no desempenho catalítico da lipase CALB, contatando-se maiores conversões para a síntese do oleato de octila, em comparação ao oleato de butila.

No estudo de Dörmo *et al.* (2004), foi investigado o efeito do comprimento da cadeia de álcoois em reações de esterificação com ácido oleico, utilizando a lipase comercial Novozym 435, que é uma preparação comercial da lipase CALB já imobilizada. Foram selecionados cinco álcoois, sendo dois deles com cadeias lineares (etanol e propanol) e três com cadeias ramificadas (álcool isopropílico, álcool isobutílico e álcool isoamílico). Os resultados obtidos nesse estudo revelaram que as taxas de esterificação do ácido oleico foram significativamente maiores com os álcoois de maior comprimento de cadeia. Essa observação indica uma correlação positiva entre o tamanho da cadeia do álcool e a eficiência da esterificação catalisada por esta lipase.

Analisando a Figura 15, nota-se que foram obtidas conversões máximas de aproximadamente 50% à 50°C, para as reações catalisadas por CALB-STY-DVB-M e CALB-STY-TEGDMA-M. Já para a reação catalisada por CALB-STY-EGDMA-M foram atingidas conversões próximas a 60% a 50 e 55 °C. Esta última reação citada é atraente do ponto de vista econômico, visto que a temperatura interfere significativamente nos gastos energéticos e, portanto, na viabilidade econômica do processo (CHIARADIA *et al.*, 2012; AZUDIN *et al.*,

2013; SBARDELOTTO, 2015). Destaca-se que essa conversão reacional não foi alcançada na síntese do oleato de butila, independente do biocatalisador e da temperatura empregada.

Figura 15 - Influência do incremento da temperatura na conversão máxima do ácido oleico na reação de esterificação na síntese do oleato de octila empregando os biocatalisadores CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M.



* Faixa de temperatura reacional de 35 – 55°C em 24h de reação.

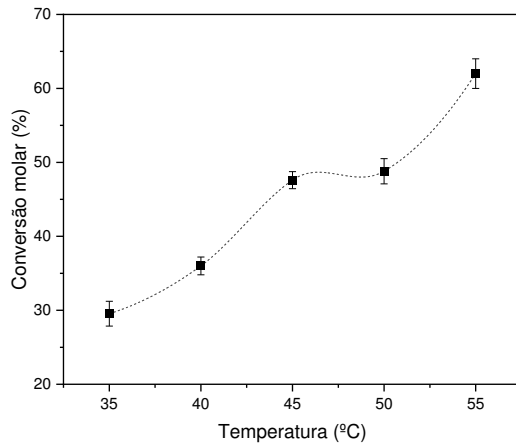
Fonte: Próprio autor.

O desempenho favorável observado na reação catalisada pela enzima CALB imobilizada nos suportes poliméricos STY-DVB-M e STY-EGDMA-M pode estar relacionado às características inerentes ao suporte utilizado. Como demonstrado na Tabela 4, os agentes reticulantes DVB e EGDMA apresentam maiores valores de log P, o que lhes confere maior hidrofobicidade, proporcionando maior interação do suporte com o substrato, resultando em maiores formações do oleato de octila (Figura 15).

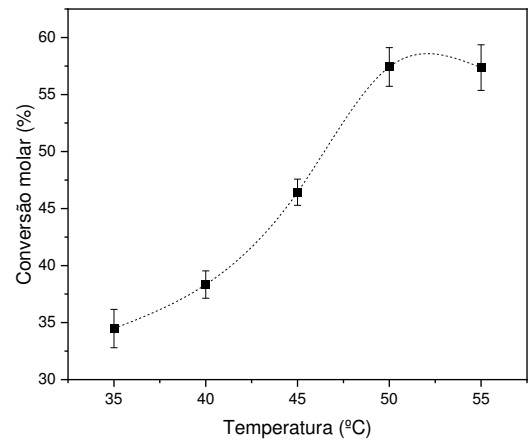
A Figura 16 permite inferir que os biocatalisadores apresentaram bom desempenho mesmo em temperaturas mais elevadas como 50 e 55°C, sendo este comportamento desejável e favorável para a síntese mediada por enzima imobilizada.

Figura 16 - Influência do incremento de temperatura no desempenho dos biocatalisadores na síntese do oleato de octila: a) CALB-STY-DVB-M, b) CALB-STY-EGDMA-M e c) CALB-STY-TEGDMA-M.

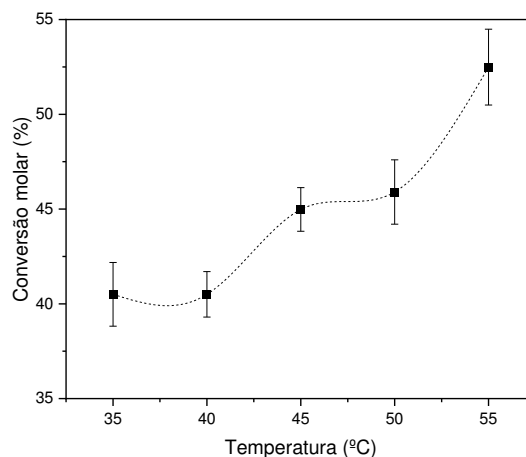
a)



b)



c)



Fonte: Próprio autor.

A obtenção de conversões maiores a temperaturas mais elevadas pode ser justificada pela dificuldade de transferência de massa entre o substrato e a enzima que ocorre em sínteses que empregam a catálise heterogênea, como o caso das enzimas imobilizadas, visto que a eficiência dessa interação depende da taxa de difusão do substrato até o sítio ativo da enzima. A elevação da temperatura favorece o movimento relativo dos componentes da mistura e minimiza a resistência à transferência de massa. No entanto, é importante destacar que o incremento da temperatura pode levar à desnaturação da enzima, comprometendo sua atividade

catalítica. Por isso, é necessário encontrar um ponto de equilíbrio entre a temperatura ideal para a catálise e a estabilidade térmica da enzima (RANGEL *et al.*, 2022; SOUZA *et al.*, 2017).

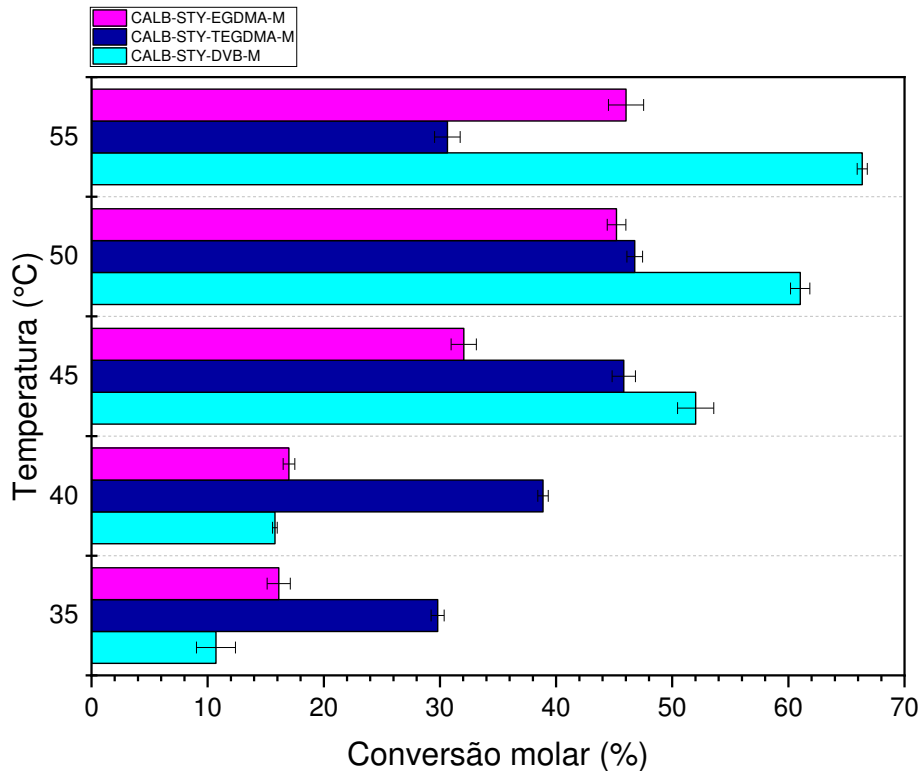
No entanto, pode-se notar na Figura 16c que a partir da temperatura de 45°C ocorre uma queda do desempenho catalítico do biocatalisador CALB-STY-TEGDMA-M, isto é, quando comparado aos demais biocatalisadores. De acordo com Rosa (2019), em seu estudo de síntese e caracterização de matrizes poliméricas para imobilização de enzimas, o reticulante TEGDMA possui uma cadeia mais longa e com maior quantidade de grupos ésteres em sua estrutura, o que pode resultar em uma menor resistência térmica das partículas de STY-TEGDMA-M em comparação aos demais copolímeros avaliados como suportes no atual estudo, corroborando com os resultados obtidos neste trabalho.

5.2.2.3 Síntese do oleato de 2-etilhexila

Com base nas discussões realizadas até o momento, torna-se viável conduzir uma avaliação da síntese do oleato de 2-etilhexila considerando diferentes perspectivas, tais como o tamanho da cadeia carbônica do substrato e a sua polaridade, além da resistência térmica do suporte. Os dados experimentais da síntese do oleato de 2-etilhexila empregando os 3 biocatalisadores sintetizados são apresentados na Figura 17, demonstrando as conversões máximas obtidas em diferentes temperaturas.

Analisando a Figura 17, nota-se que foram obtidas conversões máximas superiores a 60% a temperaturas acima de 50°C, chegando a aproximadamente 70% de conversão quando se empregou o CALB-STY-DVB-M sob 55°C. Dessa forma, constata-se que as maiores conversões obtidas dentre os 3 ésteres testados, foi encontrada para o oleato de 2-etilhexila, seguida pelo oleato de octila e por fim o oleato de butila.

Figura 17 - Influência do incremento da temperatura na conversão máxima do ácido oleico na reação de esterificação na síntese do oleato de 2-etilhexila empregando os biocatalisadores CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M.



* Faixa de temperatura reacional de 35 – 55°C em 24h de reação.

Fonte: Próprio autor.

Um primeiro aspecto a ser considerado é o tamanho da cadeia carbônica do substrato, que é o mesmo (C26) para a síntese do éster oleato de 2-etilhexila e do oleato de octila, enquanto que para a síntese do oleato de butila é de 22 carbonos. Dessa forma, baseado nos resultados do presente trabalho, nota-se que a lipase CALB demonstrou uma maior especificidade por álcoois com cadeia carbônica mais longa, com destaque para o álcool 2- etilhexila, que possui uma polaridade intermediária entre o butanol (mais polar) e o octanol (menos polar), e pode ter tido uma maior interação com o sítio ativo dessa lipase.

Observa-se na Figura 17 que foram obtidas conversões baixas quando as reações foram conduzidas nas temperaturas de 35 e 40 °C. Nessa faixa de temperatura, notou-se qualitativamente uma dispersão inadequada do biocatalisador no sistema reacional, devido à elevada viscosidade cinemática do meio reacional, o que comprometeu a transferência de massa entre as moléculas do substrato e a lipase, resultando em baixas conversões. Sendo assim, a temperatura, como dito anteriormente, é crucial na eficiência das reações.

A partir de 50°C fica evidente o melhor desempenho dos biocatalisadores CALB-STY-DVB-M e CALB-STY-EGDMA-M para a síntese do éster emoliente. Como citado previamente, para a síntese do oleato de octila, esse favorecimento da reação deve estar relacionado às estruturas químicas dos copolímeros STY-DVB e STY-EGDMA, que apresentam em sua composição agentes reticulantes mais hidrofóbicos (DVB e o EGDMA), propiciando uma maior interação do suporte com o substrato (Figura 17).

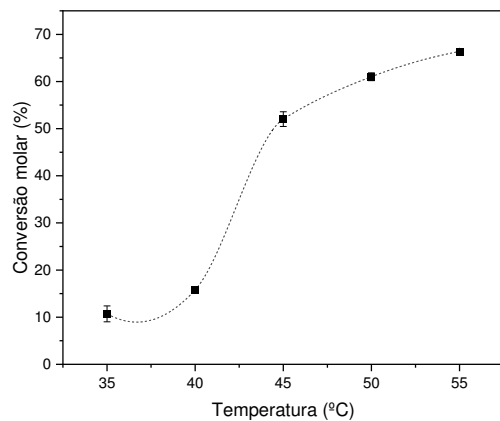
Sabe-se também que as lipases apresentam uma espécie de "tampa", uma cadeia polipeptídica hidrofóbica móvel, chamada de "lid", que protege seu sítio catalítico. Essa tampa pode apresentar-se de duas formas: aberta ou fechada, dependendo do meio externo. Assim, durante o processo de imobilização em matrizes hidrofílicas, a "lid" tende a se manter na forma fechada. Por outro lado, em suportes hidrofóbicos, a "lid" irá interagir com as porções hidrofóbicas do mesmo, apresentando-se em sua configuração aberta. Esse evento possibilita que a enzima fique fortemente adsorvida na superfície do suporte, permitindo sua estabilização, deixando o seu sítio ativo exposto para mediar a catálise (ARANA-PEÑA *et al.*, 2020; RODRIGUES *et al.*, 2019; KHAN *et al.*, 2017).

É sabido também que a termoestabilidade é uma das características mais desejáveis para as lipases imobilizadas, o que pode ser conseguido pelas interações da "lid" da lipase com o suporte, através do número das ligações de hidrogênio, da estabilização de estruturas secundárias, ocorrência de ligações dissulfetos, etc. Assim, quanto maior a hidrofobicidade do suporte, mais termoestável será o derivado imobilizado obtido (KHAN *et al.*, 2017).

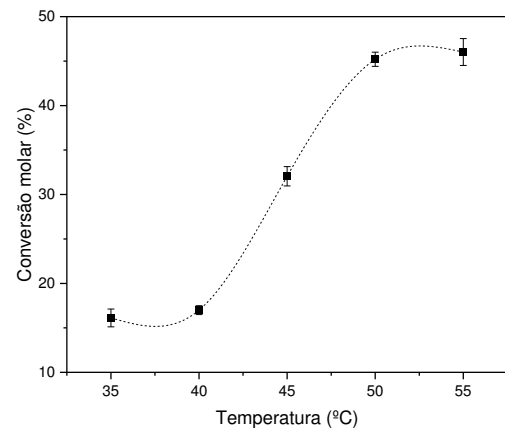
Baseado no exposto e observando-se a Figura 18, é possível sugerir hipóteses que expliquem a redução do desempenho do CALB-STY-TEGDMA-M em temperaturas superiores a 50 °C. Provavelmente porque as interações lipase/suporte foram rompidas e/ou enfraquecidas nessas condições experimentais, fazendo com que o derivado imobilizado perdesse sua termoestabilidade, não sendo capaz de realizar a catálise com eficiência. Adicionalmente, conforme mencionado por Rosa (2019) e Theodoro (2018), o monômero TEGDMA possui uma cadeia maior e com mais grupamentos ésteres, o que resulta em menor resistência térmica do copolímero de STY-TEGDMA-M.

Figura 18 - Influência do incremento de temperatura no desempenho dos biocatalisadores na síntese do oleato de 2-etilhexila: a) CALB-STY-DVB-M, b) CALB-STY-EGDMA-M e c) CALB-STY-TEGDMA-M.

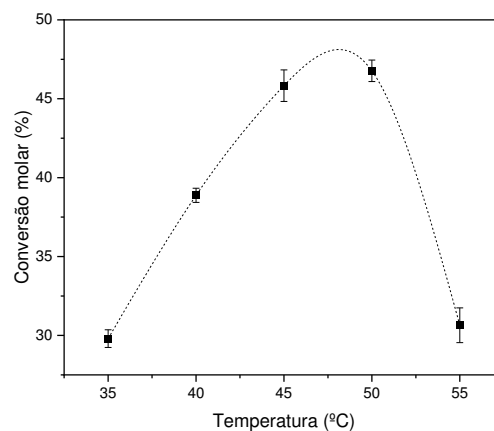
a)



b)



c)



Fonte: Próprio autor.

Além disso, os ensaios de termogravimetria (TGA) realizados por Rosa (2019) revelaram que o copolímero de STY-DVB-M é mais resistente termicamente, com início de degradação térmica em 406,66 °C, seguido pelo STY-EGDMA-M com temperatura de 369,3°C e por último o STY-TEGDMA-M, que apresenta T_{onset} de decomposição em 328,24 °C. A melhor resistência térmica apresentada pelo copolímero composto pelo DVB está provavelmente relacionada ao empacotamento dos anéis aromáticos presentes no divinilbenzeno, conferindo maior resistência, tanto química como termicamente, às partículas de STY-DVB-M, como discutido por Theodoro (2018).

Destaca-se que o uso de suportes hidrofóbicos é mais conveniente em determinados casos, como por exemplo, na síntese de ésteres catalisada por lipases, na qual um dos principais problemas é o acúmulo do composto hidrofílico (água formada) no biocatalisador, que pode levar à inativação enzimática (RODRIGUES *et al.*, 2019).

5.3. Seleção do melhor bioprocesso para a síntese de éster emoliente

Baseado em todo o exposto, pode-se inferir que os biocatalisadores sintetizados no presente trabalho, CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M, obtidos pela imobilização da lipase B de *Candida antarctica* nos diferentes copolímeros magnetizados, foram considerados adequados para a síntese dos diferentes ésteres emolientes, visto que além de apresentarem boas conversões de síntese, salientando-se a peculiaridade de cada um, contribuem com a busca por novos biocatalisadores ativos, estáveis e com propriedades adequadas para mediar a catálise de diversos bioprocessos. De acordo com Arcens *et al.*, (2020), a lipase CALB apresentou maior desempenho nas reações de esterificação da glicose quando foi empregado ácidos graxos de cadeias mais longas, comprovando os bons resultados obtidos no presente trabalho, já que foram sintetizados ésteres a partir do ácido oleico.

Em relação a maior conversão das reações de esterificação, constata-se a seguinte ordem decrescente para a síntese dos ésteres: oleato de 2-etilhexila, seguida pelo oleato de octila e por fim o oleato de butila (Figuras 17, 15 e 13). Como já visto, as máximas conversões foram obtidas para as sínteses dos ésteres oleato de 2-etilhexila e oleato de octila mediadas por CALB-STY-DVB-M.

No entanto, o copolímero STY-DVB é amplamente estudado e relatado na literatura para imobilização de lipases, como nos trabalhos de Rodrigues *et al.*, (2021), Vilas Bôas *et al.*, (2018), Manoel *et al.*, (2016) e Garcia-Galan *et al.*, (2014), todos os citados no Quadro 4, que mostram estudos desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa, empregando essa matriz magnetizada, e vários outros. Adicionalmente, Ortiz *et al.* (2019), aponta que a Novozym 435, uma preparação da lipase CALB imobilizada em uma matriz reticulada com divinilbenzeno, possivelmente é o biocatalisador comercial mais amplamente utilizado tanto no meio acadêmico, como na indústria.

Dessa forma, o bioprocesso selecionado para realizar a modelagem matemática e determinar seus parâmetros cinéticos e termodinâmicos foi a síntese do oleato de octila empregando o CALB-STY-EGDMA-M como biocatalisador.

5.4 Modelagem cinética empregando o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi

Para a construção do modelo matemático da síntese do oleato de octila empregando o biocatalisador CALB-STY-EGDMA-M, o presente estudo adotou parâmetros obtidos anteriormente em um trabalho publicado por Lopresto *et al.* (2014), no qual os autores utilizaram a lipase Novozym 435 para catalisar a síntese do éster octanoato de hexila. Vale destacar que esse biocatalisador é uma preparação comercial da lipase CALB já imobilizada. Adicionalmente, para a complementação da construção do modelo foram empregados outros parâmetros conforme explorados por Da Silva *et al.* (2020), na qual foi conduzida a síntese do palmitato de isopropila empregando a lipase G imobilizada em STY-DVB-M.

A Tabela 6 apresenta os valores de K_m , K_i e K' utilizados por Lopresto *et al.* (2014) e empregados para a construção do modelo cinético do presente trabalho.

Tabela 6 - Constantes cinéticas obtidas por Lopresto *et al.* (2014) para o mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi.

Parâmetros	Constantes cinéticas (mol L ⁻¹)
K_{mAc} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para o ácido)	17,09
K_{mAl} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para o álcool)	1,205
K_{iAc} (constante de inibição do ácido)	1,1094
K_{iAl} (constante de inibição do álcool)	3,068
K'_{iAc} (constante de inibição inversa do ácido)	0,173
K'_{iAl} (constante de inibição inversa do álcool)	0,355
K_{mES} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para o éster)	0,187
K_{mW} (constante de <i>Michalis-Menten</i> para a água)	5,856

Fonte: Adaptado de Lopresto *et al.* (2020).

Foram ajustados valores para as velocidades máximas direta e inversa à 35°C, constantes de inibição para o éster e para água, energia de ativação direta e inversa. Além disso, foram consideradas as entalpias de reação direta e inversa, visto que, o presente trabalho estudou a variação da temperatura (35 – 55 °C) na qual o biocatalisador foi exposto durante as sínteses.

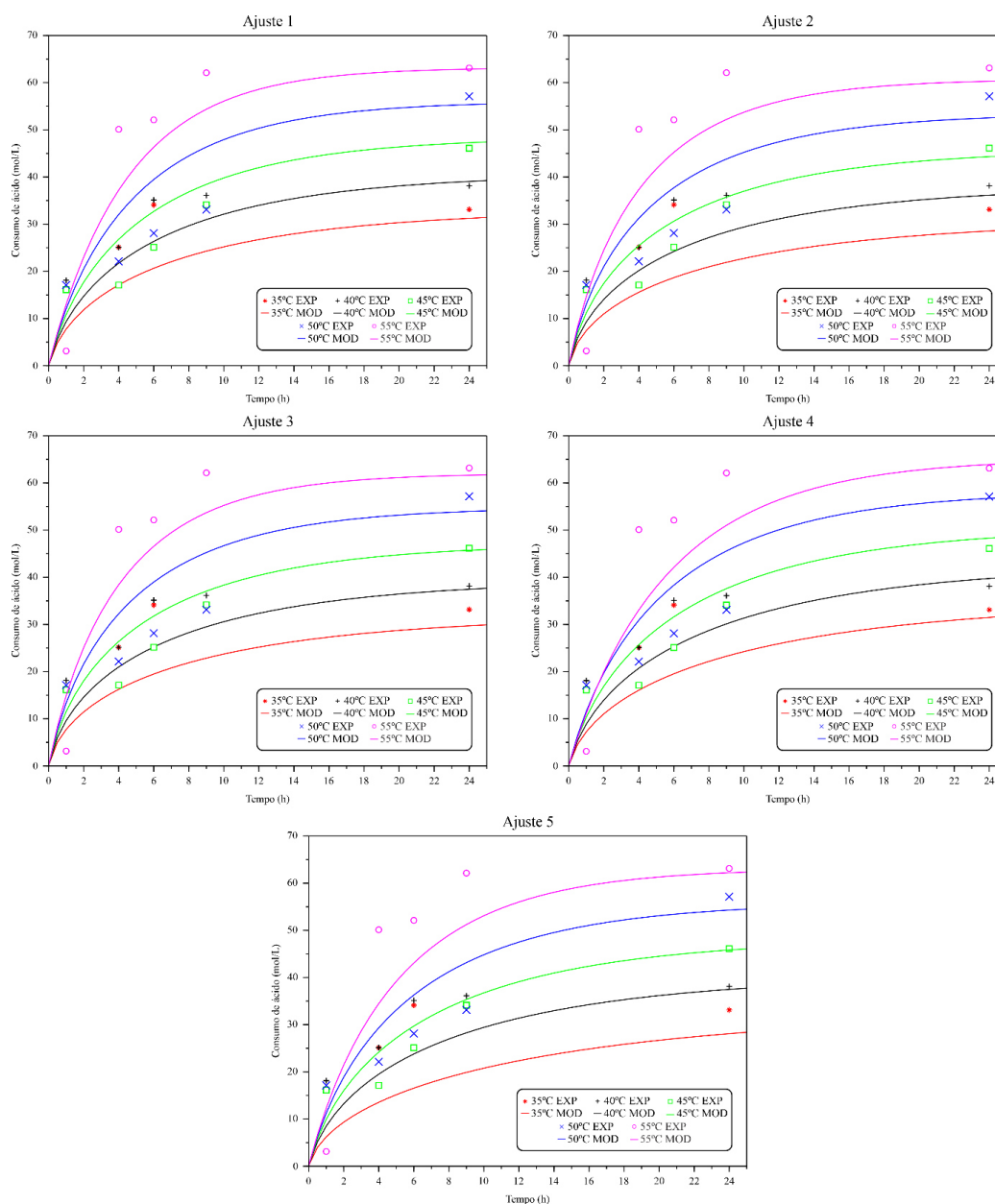
Inicialmente, a entalpia da reação global foi obtida pela equação de *Van 't Hoff* (Equação 8), que correlaciona a variação da constante de equilíbrio (K) de uma reação química e a sua temperatura absoluta (T). Foi encontrado um valor de $\Delta H = 104,60 \times 10^3 \text{ KJ mol}^{-1}$,

confirmando a natureza endotérmica das reações de esterificação. Consequentemente pôde-se ajustar a constante de equilíbrio para a faixa de temperatura experimental (35 – 55 °C).

Os demais parâmetros foram variados para a obtenção do arranjo com os melhores ajustes, por meio da taxa da reação global (r) com base no mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi (Equação 5) e na equação de *Arrhenius* (Equação 9). Após a modelagem desses dados, foi aplicado o critério de Akaike para verificação da consistência dos dados.

A Figura 19 apresenta o perfil obtido para os pontos experimentais sob as diferentes temperaturas estudadas pelo modelo adotado.

Figura 19 - Resultados obtidos para a síntese do oleato de octila utilizando o CALB-STY-EGDMA-M como catalisador, em diferentes temperaturas. Dados obtidos experimentalmente (• EXP) e para o Ajuste obtido pelo modelo (— MOD).



Fonte: Próprio autor.

Os cinco ajustes exibidos na Figura 19 estão relacionados ao modelo proposto. Cada ajuste corresponde a uma temperatura reacional específica que foi escolhida como ponto de partida para estimativa dos parâmetros (Tabelas 7 e 8). Com base nos valores obtidos do somatório dos quadrados dos resíduos, foi possível aplicar a equação do critério de Akaike (AIC) (Equação 6) e determinar os valores para o critério de Akaike corrigido (AICc) (Equação 7), conforme apresentado na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores do Critério de Akaike corrigido (AICc) para diferentes ajustes do modelo cinético da síntese do éster oleato de octila catalisada por CALB-STY-EGDMA-M.

Ajuste	Temperatura (°C)	AICc
1	35	129,6490
2	40	147,8805
3	45	135,0221
4	50	137,5204
5	55	137,0178

Fonte: Próprio autor.

O menor valor de AIC_C para a obtenção de ajuste dos parâmetros cinéticos foi de 129,6490, sendo portanto, o Ajuste 1 selecionado como mais adequado para o bioprocessamento analisado. No entanto, como o valor almejado é o mais próximo de zero possível, o AICc obtido ainda é considerado um valor elevado.

Uma hipótese que pode explicar esse valor elevado de AICc obtido é que o modelo matemático utilizado não levou em consideração os fenômenos de transferência de massa e equilíbrio de fases. A transferência de massa prevê o deslocamento dos reagentes durante a reação, o que está relacionado com a disponibilidade de substrato para a enzima e consequentemente, a formação de produto (POZO, 2015). O equilíbrio de fases reconhece as distintas solubilidades de componentes entre as fases substrato e produtos. Nesse sentido, a lipase imobilizada em um suporte polimérico pode criar microambientes com propriedades de solubilidade distintas, afetando a catálise da reação (MOHAMAD *et al.*, 2015).

A associação desses fenômenos pode exercer um impacto considerável na cinética do bioprocessamento e, quando não são incorporados ao modelo, podem resultar em um ajuste não tão adequado dos parâmetros cinéticos, contribuindo para um AICc mais elevado que o almejado.

Os valores dos parâmetros obtidos por meio dos ajustes simulados estão exibidos na Tabela 8, sendo possível observar a variação dos parâmetros reacionais à medida que a temperatura foi incrementada.

Tabela 8 - Melhores ajustes de parâmetros obtidos para a modelagem cinética empregando-se Ping-Pong Bi-Bi para a síntese do éster oleato de octila catalisada por CALB-STY-EGDMA-M.

Parâmetros	Temperaturas (°C)				
	35	40	45	50	55
K_{eq}	0,243	0,466	0,875	1,614	2,922
v_{maxd} (mol L ⁻¹ min ⁻¹)	1,8075000	1,8075014	1,8075027	1,8075040	1,8075052
v_{maxi} (mol L ⁻¹ min ⁻¹)	0,0110600	0,0110601	0,0110601	0,0110602	0,0110602
K_{iE} (mol L ⁻¹)	2,112 x 10 ²	2,865x 10 ³	3,582 x 10 ⁴	4,141 x 10 ⁵	4,443 x 10 ⁶
K_{iW} (mol L ⁻¹)	9,000 x 10 ⁵	1,168x 10 ⁶	1,503x 10 ⁶	1,921 x 10 ⁶	2,435x 10 ⁶

Em que: K_{eq} = constante de equilíbrio da reação; v_{maxd} = velocidade máxima da reação direta; v_{maxi} = velocidade máxima da reação inversa; K_{iE} = constante de inibição do álcool; K_{iW} = constante de inibição da água. Outros parâmetros estabelecidos: energia de ativação da reação direta (E_{ad}) = 1,213 x 10⁻⁴ KJ mol⁻¹; energia de ativação da reação inversa (E_{ai}) = 8,368 x 10⁻⁴ KJ mol⁻¹; variação de entalpia da reação de inibição do éster (ΔH_{riE}) = 418,68 KJ mol⁻¹; variação de entalpia da reação de inibição da água (ΔH_{riW}) = 41,868 KJ mol⁻¹.

Fonte: Próprio autor.

A constante de equilíbrio (K_{eq}) exibe valores de K_{eq} < 1 entre 35 e 45 °C, já as reações conduzidas a 50 e 55 °C mostram valores de K_{eq} > 1, demonstrando o favorecimento da formação do produto para as reações conduzidas em temperaturas mais elevadas. Esses resultados estão de acordo com os elevados valores de conversões alcançadas nessas condições experimentais, apresentados na Figura 15. Essa observação corrobora com o trabalho realizado por Garcia *et al.*, (1999), que utilizou a Novozym 435 para catalisar a síntese do palmitato de isopropila, observando também que o K_{eq} aumentava a medida que a temperatura era elevada (de 65 °C para 75 °C). Sousa *et al.* (2021), em sua revisão sobre aspectos relevantes para a esterificação enzimática (sistema livre de solventes) do ponto de vista termodinâmico e cinético, atestam que foram observadas variações nas constantes de equilíbrio sob diferentes temperaturas, mas que estas foram mínimas.

Yanav e Magadum (2017) abordaram outra perspectiva, em que afirmam que as enzimas não alteram as constantes de equilíbrio das reações, visto que, atuam tanto na reação direta, quanto inversa, afetando somente a taxa do alcance do equilíbrio.

Analisando os valores apresentados para as velocidades máximas diretas e inversas da reação (Tabela 8), não foi observada influência relevante em função da variação da temperatura reacional (35 – 55 °C). Este fato infere que, na faixa de temperatura estudada, a cinética enzimática não foi sensível às alterações de temperatura, já que é sabido que, o aumento da temperatura diminui a viscosidade do meio reacional, e poderia ter influenciado a velocidade da reação. Como essa observação não foi constatada, sugere-se que a atividade da enzima foi mantida constante no intervalo de temperatura analisado. Adicionalmente, esta observação pode estar relacionada ao fato de todas as reações terem sido realizadas com a mesma razão molar entre os reagentes (1:1) (SORENSEN et al., 2015).

É importante destacar que as reações realizadas no presente trabalho foram conduzidas em meio livre de solvente, e de acordo com o estudo realizado por Kuperkar *et al.* (2014), o uso de solventes em reações de esterificação tem um impacto direto na velocidade máxima das reações, podendo resultar em uma redução de aproximadamente 50% em relação as reações conduzidas em meio isento de solvente. Esse relato atribui ao presente estudo um notável diferencial, uma vez que as reações apresentaram um bom desempenho na produção de ésteres emolientes, mesmo sem o uso de solvente, o que torna o processo biotecnológico mais viável tanto em termos econômicos quanto ambientais.

Ainda de acordo com a Tabela 8, a estimativa das constantes de inibição do éster e da água permitiu inferir que a água possui maior afinidade pela enzima CALB, em toda faixa estudada, resultando em inibições mais relevantes. Essa análise corrobora com a idéia de que a presença da água no meio reacional pode afetar consideravelmente o poder catalítico das lipases.

É relevante destacar que o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi é pouco explorado pela literatura quando construído mediante a variação de temperatura, como realizado no presente trabalho, e esse fato implica na dificuldade em realizar comparações com dados da literatura, devido à escassez de informações similares. Autores como Gawas *et al.* (2018), Gonçalves *et al.* (2021), Waghmare *et al.* (2017) e Kuperkar *et al.* (2014), construíram a modelagem da cinética enzimática considerando parâmetros como: razão molar e razão mássica entre os substratos e o biocatalisador. Além disso, esses autores não consideraram os parâmetros que

foram avaliados aqui, como as constantes de inibição do éster e da água durante as sínteses realizadas.

Essa inserção de parâmetros na construção do modelo cinético, confere ao presente estudo uma maior relevância no que tange as pesquisas sob o ponto de vista cinético das reações catalisadas enzimaticamente, contribuindo para a obtenção de modelos preditivos mais completos, possibilitando a implementação do bioprocessamento em escala industrial. A análise desses dados proporciona informações valiosas sobre o comportamento da enzima em diferentes condições e pode ser fundamental para o desenvolvimento de estratégias otimizadas em biotecnologia.

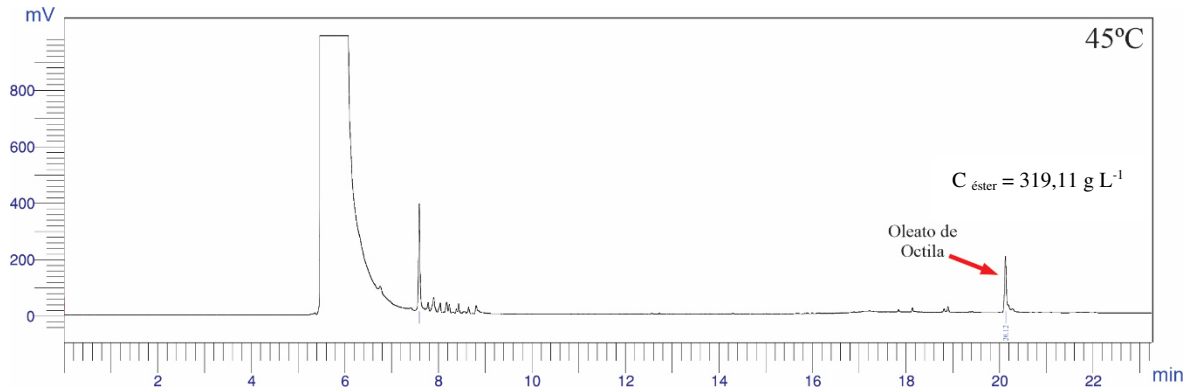
5.5 Quantificação do éster oleato de octila por cromatografia em fase gasosa

Visando verificar a formação do éster oleato de octila e assim comprovar a idealidade do modelo matemático proposto para o bioprocessamento selecionado, as amostras finais coletadas das reações contendo como substrato ácido oleico e octanol e CALB-STY-EGDMA-M como biocatalisador, conduzidas sob as temperaturas de 45, 50 e 55°C (melhores conversões obtidas) foram analisadas em cromatógrafo gasoso.

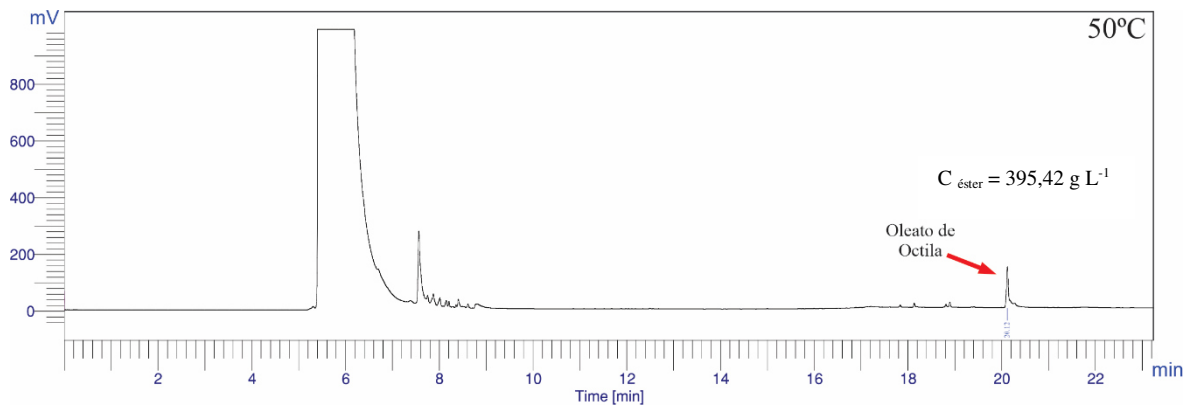
A Figura 20 mostra os cromatogramas referentes a formação do éster oleato de octila após 24h de percorrida a reação de esterificação.

Figura 20 - Cromatogramas obtidos na síntese do oleato de octila empregando o biocatalisador CALB-STY-EGDMA-M a: a) 45°C b) 50 °C e c) 55 °C.

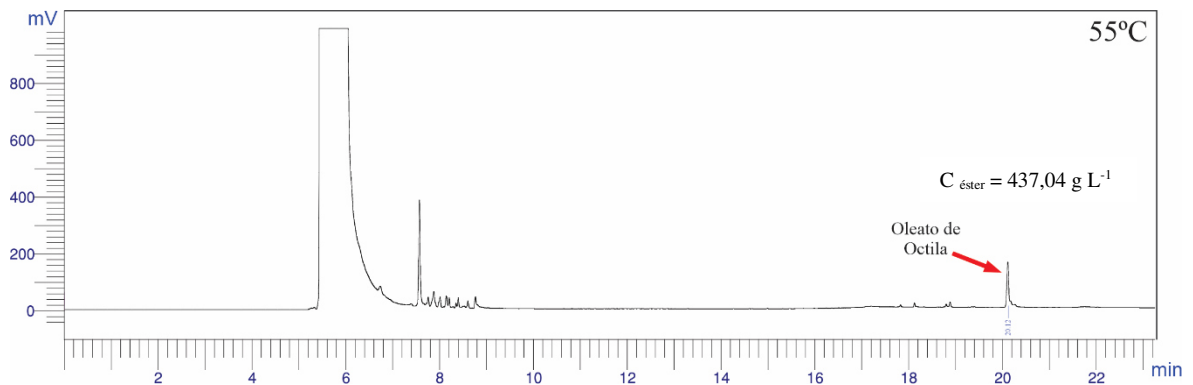
a)



b)



c)



Fonte: Próprio autor.

A partir dos cromatogramas obtidos na Figura 20 foi possível constatar a formação do éster emoliente oleato de octila nas biossínteses realizadas, confirmando os resultados experimentais obtidos e evidenciando um aumento na conversão da reação em função do incremento da temperatura.

6 CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste trabalho, é notável que todos os biocatalisadores obtidos pela lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em diferentes suportes híbridos magnetizados à base de estireno foram capazes de catalisar a síntese dos ésteres emolientes em meio isento de solvente. A influência de fatores, como: razão molar entre os reagentes, influência da temperatura na conversão da reação, características do substrato e do biocatalisador, foi avaliada, visando selecionar as condições mais adequadas para a obtenção do éster emoliente, sendo possível concluir que:

- As maiores concentrações em éster foram obtidas na proporção estequiométrica (razão molar de 1:1 ácido:álcool), devido a menor diluição dos produtos no meio reacional, o que favorece a síntese do produto e facilita as etapas de down stream.
- Os três biocatalisadores sintetizados (CALB-STY-DVB-M, CALB-STY-EGDMA-M e CALB-STY-TEGDMA-M) apresentaram atividade catalítica satisfatória na hidrólise do butirato de metila.
- A conversão máxima das reações de esterificação respeitou a seguinte ordem decrescente: oleato de 2-etilhexila (68%), seguida pelo oleato de octila (62%) e por fim o oleato de butila (48%), na qual foi possível elucidar características dos biocatalisadores e da influência do tamanho da cadeia carbônica e da polaridade do álcool, constituintes do meio reacional, no desempenho das sínteses.
- O bioprocesso selecionado para a construção do modelo matemático foi a síntese do éster oleato de octila catalisada pelo CALB-STY-EGDMA-M, devido a obtenção de conversões reacionais elevadas e a utilização de novas matrizes poliméricas para imobilização de lipase, alternativas ao estireno divinilbenzeno.
- O modelo cinético foi construído a partir do mecanismo de Ping-Pong Bi-Bi com o auxílio da equação de *Van't Hoff*, sendo possível confirmar a natureza endotérmica da reação de esterificação ($\Delta H = 104,60 \times 10^3 \text{ KJ mol}^{-1}$). O critério de Akaike corrigido (AICc) possibilitou selecionar o arranjo de parâmetros que melhor se ajustasse aos dados experimentais, obtendo-se o menor valor de $AICc = 129,6490$.

- A partir da A partir da obtenção dos cromatogramas, por análise de cromatografia em fase gasosa, foi possível confirmar a formação do éster oleato de octila.
- É válido destacar que o mecanismo Ping-Pong Bi-Bi é pouco explorado pela literatura da maneira como foi desenvolvido no presente trabalho, na qual considerou a variação de temperatura e as constantes de inibição do éster e da água. Estas diferenças tornam o presente estudo relevante nessa área de estudos de cinética enzimática, contribuindo para a obtenção de modelos mais completos e que possibilite a implantação de bioprocessos em escalas industriais.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados alcançados é possível almejar a continuidade dos estudos para a aplicação de biocatalisadores obtidos a partir da imobilização de diferentes lipases nos copolímeros magnetizados sintetizados no presente trabalho, bem como a continuidade das reações de síntese dos ésteres de forma maximizada. Para estas finalidades, sugere-se:

- Purificar e caracterizar os ésteres produzidos, comparando-os com os obtidos pelo processo convencional.
- Estudar outras condições reacionais para a síntese dos ésteres obtidos, a fim de maximizar as conversões e diminuir o tempo de reação. Além disso, estudar a viabilidade de se utilizar outras lipases, como por exemplo, para a síntese do oleato de butila.
- Estudar a síntese dos ésteres emolientes em outras configurações de biorreatores e modo de operação do bioprocessamento, como a obtenção do éster emoliente a partir de um processo contínuo (leito fixo e/ou tanque agitado).
- Estudar a estabilidade operacional dos biocatalisadores sintetizados.
- Utilizar subprodutos industriais como fonte de matéria-prima para a síntese de ésteres emolientes, como por exemplo, empregar a borra ácida e os ácidos graxos destilados, provenientes dos processos de refino de óleos vegetais.
- Avaliar a viabilidade técnica e econômica da produção de ésteres emolientes utilizando os biocatalisadores obtidos a partir dos copolímeros magnetizados.
- Investigar o desempenho dos ésteres emolientes obtidos via catálise enzimática em formulações cosméticas, como cremes, loções e produtos de cuidados com a pele.

REFERÊNCIAS

- ABIS, G.; PACHECO-GÓMEZ, R.; BUI, T. T. T.; CONTE, M. R. Isothermal titration calorimetry enables rapid characterization of enzyme kinetics and inhibition for the human soluble epoxide hydrolase. **Analytical Chemistry**, v. 91, p. 14865-14872, 2019.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6406-6436, 2013.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; PAPADAKI, A.; MALLOUCHOS, A.; MANDALA, I.; HOMERO, S.; FREIRE, D. M. G.; KOUTINAS, A. A. Enzymatic synthesis of bio-based wax esters from palm and soybean fatty acids using crude lipases produced on agricultural residues. **Industrial Crops and Products**, v. 139, 2019.
- AKERMAN C. O.; GABER Y.; GHANI N. A.; LAMSA, M.; HATTI-KAUL, R. Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p. 263-269, 2011.
- ALMEIDA, L.; MARCONDES, T.; MILAGRE, C.; MILAGRE, H.; Lipase-oxovanadium heterogeneous catalysis system: a robust protocol for the dynamic kinetic resolution of sec-alcohols. **ChemCatChem**, v. 12, p. 2849-2858, 2020.
- ALSULTAN, A.G.; ASIKIN-MIJAN, N.; IBRAHIM, Z.; YUNUS, R.; RAZALI, S.Z.; MANSIR, N.; ISLAM, A.; SEENIVASAGAM, S.; TAUFUQ-YAP, Y.H. A Short Review on Catalyst, Feedstock, Modernised Process, Current State and Challenges on Biodiesel Production. **Catalysts**, v. 11, p. 1-36, 2021.
- ALTINKAYNAK, C; TAVLASOGLU, S; OCSOY, I. A new generation approach in enzyme immobilization: Organic-inorganic hybrid nanoflowers with enhanced catalytic activity and stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 93, p. 105-112, 2016.
- ALVES, G. C. S. **Utilização dos Óleos de Fritura para a Produção de Biodiesel**. Trabalho de Conclusão do Curso (Tecnologia em Biocombustíveis), Faculdade de Tecnologia de Araçatuba, Araçatuba, 2010.
- ALVES, M. D.; CREN, E. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 377-387, 2016.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. **Biotechnology**, v. 11, p. 100-118, 2012.
- ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and perspectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 257-270, 2016.
- ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilized lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p.6475-6490, 2013.
- ARANA-PEÑA, S.; LOKHA, Y.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization on octyl-agarose beads and some catalytic features of commercial preparations of lipase a from *Candida antarctica* (Novocor ADL): comparison with immobilized lipase B from *Candida antarctica*. **Biotechnology Progress**, v. 35, p. e2735, 2019.
- ARCENS, D.; GRAU, E.; GRELIER, S.; CRAMAIL, H.; PERUCH, F. Impact of fatty acid structure on CALB-catalyzed esterification of glucose. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 4, p. 1900294, 2020.

ARMAREGO, Wilfred L.F.; CHAI, Christina. Purification of Organic Chemicals. In: ARMAREGO, Wilfred L.F.; CHAI, Christina (Eds.). **Purification of Laboratory Chemicals**. 7th ed. Butterworth-Heinemann, 2013. p. 117.

ATTIA, N.K.; EL-MEKKAWI, S.A.; ELARDY, O.A.; ABDELKADER, E.A. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, v. 271, p. 1-6, 2020.

BAI, F.; YAN, W.; ZHANG, S.; YU, D.; BAI, L. Immobilized lipase of reconstructed oil bodies and its potential application in biodiesel production. **Fuel**, v. 128, p. 340-346, 2014.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220-1227, 2012.

BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. 4th ed. New York: CRC Press, 2014. p. 99.

BARSÉ, L. Q.; GRAEBIN, N.G.; CIPOLATTI, E.P.; ROBERT, J.M.; PINTO, M.C.; PINTO, J.C.; FREIRE, D.M.; RODRIGUES, R.C. Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 34, p. 389-397, 2019.

BASSI, J. J.; TODERO, L. M.; LAGE, F. A.; KHEDY, G. I.; DUCAS, J. D.; CUSTÓDIO, A. P.; PINTO, M. A.; MENDES, A. A. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900-909, 2016.

BBC RESEARCH **Global markets for enzymes in industrial applications**. 2019.

BENTO, H. B. S.; DE CASTRO, H. F.; 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.

BENTO, H. B. S. **Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)**. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

BESTETI, M. D. **Produção e Caracterização de Partículas Casca-Núcleo Obtidas pela Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão**. 2009. 159p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

BEZBRADICA, D.; CROVIC, M.; TANASKOVIC, S. J.; LUKOVIC, N.; CAREVIC, M.; MILIVOJEVIC, A.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic Syntheses of Esters - Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 104-138, 2017.

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; SILER-MARINKOVIĆ, S.; KNEZEVIC, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, p. 97-101, 2007.

BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and Enzyme Technology**. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, p. 626, 2012.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros: Um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 3.ed. São Paulo: Artliber, 2010.

CAO, L.; LANGEN, L. V.; SHELDON, R.A. Immobilized enzymes: carrier-bound or carrier-free? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 387-394, 2003.

CAO, S.; XU, P.; MA, Y.; YAO, X.; YAO, Y.; ZONG, M.; LI, X.; LOU, W. Recent advances in immobilized enzymes on nanocarriers. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 37, n. 11, p. 1814-1823, 2016.

CARNEIRO, E. A.; BASTOS, A. K. P.; OLIVEIRA, U. M. F. de.; MATOS, L. J. B. L. de.; ADRIANO, W. S.; MONTEIRO, R. R. de C.; SANTOS, J. C. S. dos.; GONÇALVES, L. R. B. Improving the catalytic features of the lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on chitosan-based hybrid matrices by altering the chemical activation conditions. **Química Nova**, v. 43, n. 9, p. 1234-1239, 2020.

CARRAHER JUNIOR, C. E. **Introduction to Polymer Chemistry**. 2nd ed. Los Angeles: Taylor and Francis Group, LLC., 2010. 510p.

CARVALHO, C. F. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma enzima Lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio**. 2015. 161p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CASTIGLIONI, G. L.; CUELLAR, J.; RODRIGO, R.; COSTA, J. V.; MONTE-ALEGRE, R. Application of Poly(styrene-co-divinylbenzene) macroporous microparticles as a catalyst in the enzymatic synthesis of biodiesel. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 25, p. 264-273, 2016.

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

CASTRO, H. F.; ZANIN, G.M.; MORAES, F. F.; SÁ-PEREIRA, P. Imobilização de enzimas e sua estabilização; In: BON, E.P.S.; FERRAR, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. p. 123-151.

CASTRO, R. J. S., SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α -amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

CAVALLARO, V.; TONETTO, G.; FERREIRA, M. L. Optimization of the Enzymatic Synthesis of Pentyl Oleate with Lipase Immobilized onto Novel Structured Support. **Fermentation**, v. 5, n. 2, p. 48, 2019.

CAVALCANTE, P. M. M.; SILVA, R. L.; FREITAS, J. J. R.; FREITAS, J. C. R.; FREITAS FILHO, J. R. Proposta de preparação e caracterização de ésteres: um experimento de análise orgânica na graduação. **Educación Química**, v. 26, p. 319-329, 2015.

CHAO, C.; GÉNOT, C.; RODRIGUEZ, C.; MAGNIEZ, H.; LACOURT, S.; FIEVEZ, A.; LEN, C.; PEZRON, I.; LUART, D.; HECKE, E. Emollients for cosmetic formulations: Towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 156-164, 2018.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P.K. Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. **Microbial Cell Factories**, v.19, p.1-42, 2020.

CHANG, J. J.; HO, F. J.; HO, C. Y.; WU, Y. C.; HOU, Y. H.; HUANG, C. C.; SHIH, M. C.; LI, W. H. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 6, n. 1, p. 19, 2013.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A. E.; DINU, C. Z. Industrial applications of enzymes: recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v. 238, p. 1-26, 2018.

CHIARADIA, V.; SOARES, N. S.; VALÉRIO, A.; DE OLIVEIRA, D.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on magnetic poly(urea-urethane) nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, p. 558-575, 2016.

CHOI, J.; HAN, S.; KIM, H. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CHOWDHURY, A.; CHAKRABORTY, R.; MITRA, D.; BISWAS, D. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physicochemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783-789, 2014.

CIPOLATTI, E.P.; VALÉRIO, A.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B.C. Stabilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* by crosslinking in PEGylated polyurethane particles by polymerization: Application on fish oil ethanolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 112, p. 54-60, 2016.

CORTEZ, D. V.; REIS, C.; PEREZ, V. H.; DE CASTRO, H. F. The Realm of Lipases in Biodiesel Production. In: SINGH, O. V.; CHANDEL, A. K. (eds.). (Org.). **Sustainable Biotechnology - Enzymatic Resources of Renewable Energy**. Springer International Publishing, 2018. v. 1, p. 247-288.

CUNHA, A. G.; BESTETI, M. D.; MANOEL, E. A.; DA SILVA, A. A. T.; ALMEIDA, R. V.; SIMAS, A. B. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the support nature on catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59-67, 2014.

DA SILVA, MATEUS V.; RANGEL, AMANDA B. S.; DUTRA, FELLIPE P.; DE CASTRO, HEIZIR F.; DE FREITAS, LARISSA. Kinetic and Thermodynamic Study of 2-Ethylhexyl Oleate Synthesis Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase Immobilized on a Magnetic Hybrid Support. **Catalysis Letters**, v. 151, p. 1239-1247, 2021.

DA SILVA, MATEUS V. C.; SOUZA, AMANDA B.; DE CASTRO, HEIZIR F.; AGUIAR, LEANDRO G.; DE OLIVEIRA, PEDRO C.; DE FREITAS, LARISSA. 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, p. 615-623, 2020.

DA SILVA, M.V.C.; RANGEL, A.B.S.; AGUIAR, L.G.; DE CASTRO, H.F.; FREITAS, L. Continuous enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl oleate in a fluidized bed reactor: operating conditions, hydrodynamics, and mathematical modeling. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 59, p. 19522-19530, 2020.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. d. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

DASIKA, S. K.; VINNAKOTA, K. C.; BEARD, D. A. Determination of the catalytic mechanism for mitochondrial malate dehydrogenase. **Biophysical Journal**, v. 108, n. 2, p. 408-419, 2015.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. Modificação Enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício. In: **Biocatálise e Biotransformação - Fundamentos e Aplicações**. São Paulo: Schoba, 2010. v. 1, p. 275-337.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274-1278, 2008.

DÖRMO, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Manufacture of and environmental safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v.21, n.3, p. 229-234, 2004.

DUSSÁN, K. J.; CARDONA, C. A.; GIRALDO, O. Immobilization and characterization of the *Candida rugosa* lipase enzyme on magnetic particles. **Revista Mexicana de Física**, v. 58, p. 47-51, 2012.

DUTRA, C. P. **Avaliação do efeito de suportes mistos de sílicas fluoradas sobre a produtividade de catalisador metaloceno suportado**. 2019. 53p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2019.

FACCIO, C. **Estudo da produção de ésteres etílicos a partir da alcoólise de óleos vegetais**. 2004. 99p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2004.

FAKIROV, S. **Fundamentals of Polymer Science for Engineers**. Weinheim: Wiley-VCH, 2017. 408p.

FAN, G.; LIAO, C.; FANG, T.; LUO, S.; SONG, G. Amberlyst 15 as a new and reusable catalyst for the conversion of cellulose into cellulose acetate. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 203-209, 2014.

FERNANDES, K. V.; CAVALCANTI, E. D. C.; CIPOLATTI, E. P.; AGUIEIRAS, E. C. G.; PINTO, M. C. C.; TAVARES, F. A.; SILVA, P. R. da; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARANA-PEÑA, S.; PINTO, J.C.; ASSUNÇÃO, C. L. B.; SILVA, J. A. C. da; FREIRE, D. M. G. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, v. 362, p. 122-129, 2021.

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

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; GORINES, B. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 98, p. 18-25, 2017.

FIGUEIREDO, K. C. S.; SALIM, V. M. M.; BORGES, C. P. Ethyl oleate production by means of pervaporation-assisted esterification using heterogeneous catalysis. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, p. 609-617, 2010.

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

FRIED, J. R. **Polymer science & technology**, 3th ed. Westford, Massachusetts: Prentice Hall: 2014. 688p.

FRIED, J. R. **Polymer Science & Technology**. 2nd ed. Westford, Massachusetts: Prentice Hall: 2003. 582p.

GANDHI, N. N.; PATIL, N. S.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; WANGIKAR, P. P.; MUKESH, D. Lipase-catalyzed esterification. **Catalysis reviews - Science and Engineering**, v. 42, p. 439-480, 2000.

GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; HERNANDEZ, K.; DOS SANTOS, J.C.S.; RODRIGUES, R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of styrene-divinylbenzene beads as a support to immobilize lipases. **Molecules**, v. 19, p. 7629-7645, 2014.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty esters Part I, Kinetic Approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 584-590, 1999.

GAWAS, Sarita D.; LOKANATH, Nidya; RATHOD, Virendra K. Optimization of enzymatic synthesis of ethyl hexanoate in a solvent free system using response surface methodology (RSM). **Biocatalysis**, v. 4, n. 1, p. 14-26, 2018

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

Gonçalves, M. C. P., Amaral, J. C., Fernandez-Lafuente, R., Sousa Junior, R. D., & Tardioli, P. W.; Lipozyme 435-mediated synthesis of xylose oleate in methyl ethyl ketone. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3317, 2021.

GORCEA, M.; LAURA, D. Evaluating the physiochemical properties of emollient esters for cosmetic use. **International Specialty Products**, v. 31, 2013.

GOTOR-FERNANDEZ V.; BRIEVA, R.; GOTOR, V. Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 111-120, 2006.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J.D.; DOUTHILLIER, F.; SMITH, P.; HARRISON, D.; RUBIN, B.; CYGLER, M. Insights into interfacial activation form an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 12843-12847, 1993.

GUSTAVO, M. F.; SZEKELY, E.; TOTH, J. Kinetic modeling of a consecutive enzyme-catalyzed enantioselective reaction in supercritical media. **ACS Omega**, v. 5, p. 26795-26806, 2020.

GUVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOGLU, U. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v.38, p. 379-386, 2002.

HATTORI, M.; SUDOL, E. D.; EL-AASSER, M. S. Highly crosslinked polymer particles by dispersion polymerization. **Journal of applied polymer science**, v. 50, n. 11, p. 2027-2034, 1993.

HUANG, Y.; JI, X.; MA, Z.; ŁĘŻYK, M.; XUE, Y.; ZHAO, H. Green chemical and biological synthesis of cadaverine: recent development and challenges. **RSC Advances**, v. 11, p. 23922-23942, 2021.

ITABAIANA-Jr, I.; MIRANDA, L. S. M.; de SOUZA, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 85-86, p. 1-9, 2013.

IZQUIERDO, D. F.; BARBOSA, O.; BURGUETE, M. I.; LOZANO, P.; SANTIAGO, V. L.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GARCÍA-VERDUGO, E. Tuning lipase B from *Candida antarctica* C–C bond promiscuous activity by immobilization on poly-styrene-divinylbenzene beads. **RSC Advances**, v. 4, n. 12, p. 6215-6219, 2014.

JAVED, S.; AZEEM, F.; HUSSAIN, S.; RASUL, I.; SIDDIQUE, M. H.; RIAZ, M.; AFZAL, M.; KOUSER, A.; NADEEM, H. Bacterial lipases: A review on purification and characterization. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 132, p. 23-34, 2018.

JEOH, T.; CARDONA, M. J.; KARUNA, N.; MUDINOOR, A. R.; NILL, J. Mechanistic kinetic models of enzymatic cellulose hydrolysis-a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 114, n. 7, p. 1369-1385, 2017.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, n. 5-6, p. 801-821, 2014.

- JIANG, Y.; LIU, H.; WANG, L.; ZHOU, L.; HUANG, Z.; MA, L.; HE, Y.; SHI, L.; GAO, J. Virus-like organosilica nanoparticles for lipase immobilization: characterization and biocatalytic applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 125-134, 2019.
- JUNIO, R.L.F.; OLIVEIRA, R.; PONZIO, E. A new hybrid electrochromic material: vanadium oxide/eriochrome black T. In: 17th International Conference on Solid Films and Surfaces. ., **Materials Science and Engineering**, 5p, 2015.
- KAHRAMAN, M. V.; BAYRAMOĞLU, G.; KAYAMAN-APOHAN, N.; KAYAMAN-APOHAN, N.; GÜNGÖR, A. α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1385-1392, 2007.
- KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 555-569, 2012.
- KATO, M.; SAKAI-KATO, K.; MATSUMOTO, N.; TOYO'OKA, T. A protein-encapsulation technique by the sol-gel method for the preparation of monolithic columns for capillary electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 1915-1921, 2002.
- KHAN, M.; HUSAIN, Q.; BUSHRA, R. Immobilization of β -galactosidase on surface modified cobalt/multiwalled carbon nanotube nanocomposite improves enzyme stability and resistance to inhibitor. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 105, p. 693-701, 2017.
- KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793-1806, 2015.
- KHAN, Z.; JAVED, F.; SHAMAIR, Z.; HAFEEZ, A.; FAZAL, T.; ASLAM, A.; ZIMMERMAN, W.B.; REHMAN, F. Current developments in esterification reaction: A review on process and parameters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 103, p. 80-101, 2021.
- KHARISSOVA, O. V.; KHARISOV, B. I.; GONZÁLEZ, C. M. O.; MÉNDEZ, Y. P.; LÓPEZ, I. Greener synthesis of chemical compounds and materials. **Royal society open science**, v.6, p. 1-41, 2019.
- KHOABI, M.; MOTEVALIZADEH, S. F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, A.; FARAMARZI, M. A. Synthesis of functionalized polyethylenimine-grafted mesoporous silica spheres and the effect of side arms on lipase immobilization and application. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p.131-141, 2014.
- KIM, H.; KIM, T.; CHOI, N.; KIM, B. H.; OH, S.; KIM, I. Synthesis of diethylhexyl adipate by *Candida antarctica* lipase-catalyzed esterification. **Process Biochemistry**, v. 78, p. 58-62, 2019.
- KOLTEZENBURG, S.; MASKOS, M.; NUYKEN. **Polymer Chemistry**. Berlím: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2017. 584 p.
- KULKARNI, S., J. Enzyme Immobilization: Research and Studies. **International Journal of Research & Review**, v. 3, 2016.
- KUMAR, A.; DHAR, K.; KANWAR, S. S; ARORA, P. K. Lipase catalysis in organic solvents: advantages and applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, p. 2, 2016.
- Kuperkar, V. V., Lade, V. G., Prakash, A., & Rathod, V. K.. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143-149, 2014.

- LAGE, F. A.; BASSI, J. J.; CORRADINI, M. C.; TODERO, L. M.; LUIZ, J. H.; MENDES, A. A. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, n. 1, p. 56, 2016.
- LAMSA, M. **Environmentally friendly products based on vegetable oils**. 1995. Tese (Doutorado) - Helsinki University of Technology, 1995.
- LANZENDORFER, G. Lipids in skin care formulations. In: DEKKER, M. (Ed.). **Cosmetic Lipids and the Skin Barrier**. New York: CRC Press, 2002. p. 255-297.
- LIMA, L. C. D.; PERES, D. G. C.; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 991-1002, 2018.
- LIMA, R. M.; DOS ANJOS, C. S.; OROZCO, E. V. M.; PORTO, A. L. M. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Molecular Catalysis**, v. 466, p. 7-105, 2019.
- LIU, W.; DUAN, H.; MENG, X.; QUIN, D.; WANG, X.; ZHANG, J. Immobilization of *Candida lipolytica* Lipase on Macroporous Beaded Terpolymers with Epoxy Groups. **Journal of Applied Polymer Science**, p. 4251-4255, 2013.
- 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.
- MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**. 2.ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.
- MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros**, v. 17, n. 2, p. 166-179, 2007.
- MACHADO, N. B. **Preparação e caracterização de partículas de sílica da casca de arroz funcionalizada na imobilização de lipase e aplicação na síntese de ésteres**. 2018. 74p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.
- MANDARI, V.; DEVARAI, S.K. Biodiesel Production Using Homogeneous, Heterogeneous, and Enzyme Catalysts via Transesterification and Esterification Reactions: a Critical Review. **Bioenergy Research**, v. 15, p. 935-961, 2022.
- MANOEL, E. A.; PINTO, M.; DOS SANTOS J. C. S.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Design of a core-shell support to improve lipase features by immobilization. **Royal Society of Chemistry Advances**, v. 6, p. 62814-62824, 2016.
- MAO, Y.; CAI, Z.; ZHOU, C.; LAN, H.; YE, X. Characteristics of Crosslinking Polymers Play Major Roles in Improving the Stability and Catalytic Properties of Immobilized *Thermomyces lanuginosus* Lipase. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 6, p. 2917, 2022.
- MARANGONI, A. G. **Enzyme Kinetics - A modern Approach**. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., 2003. p. 248.
- MARQUES, P. R. B.; YAMANAKA, H. Biossensores Baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791-1799, 2008.
- MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. L. R.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 417-422, 2013.

- MASTRIA, R.; RIZZO, A.; GIANSANTE, C.; BALLARINI, D.; DOMINICI, L.; INGANAS, O.; GIGLI, G. Role of polymer in hybrid polymer/PbS quantum dot solar cells. **The Journal of Physical Chemistry C**, p. 14972-14979, 2015.
- MEHRASBI, M. R.; MEHRASBIA, M. R.; MOHAMMADI, J.; PEYDA, M.; MOHAMMADI, M. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. **Renewable Energy**, v. 101, p. 593-602, 2017.
- MEI, S.; HAN, P.; WU, H.; SHI, J.; TANG, L.; JIANG, Z.; MELLER, K.; SZUMSKI, M.; BUSZEWSKI, B. One-pot fabrication of chitin-shellac composite microspheres for efficient enzyme immobilization. **Journal of biotechnology**, v. 266, p. 1-8, 2018.
- MENDES, A. S.; DE CASTRO, H. F.; RODRIGUES, D. S.; ADRIANO, W. S.; TARDIOLI, P. W.; MAMMARELLA, E. J.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. L.C. Multipoint covalent immobilization of lipase on chitosan hybrid hydrogels: influence of the polyelectrolyte complex type and chemical modification on the catalytic properties of the biocatalysts. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 1055-1066, 2011.
- MICHAELIS, L.; MENTEN, M. L. Die Kinetik der Investinwirkung. **Biochem Z**, v. 49, p. 1-34, 1913.
- MIGUEZ, J. P.; GAMA, R. S.; BOLINA, I. C. A.; MELO, C. C.; CORDEIRO, M. R.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, p. 296-308, 2018.
- MILED, N.; BEISSON, F.; CARO, J.; CARO, A.; ARONDEL, V.; VERGER, R. Interfacial catalysis by lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, p. 165-171, 2001.
- MOHAMAD, N. R.; MARZUKI, N. H.; BUANG, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205-220, 2015. DOI: 10.1080/13102818.2015.1008192.
- MONTIEL, M. C.; SERRANO, M.; MÁXIMO, M.F.; GÓMEZ, M.; ORTEGA-REQUENA, S.; BASTIDA, J. Synthesis of cetyl ricinoleate catalyzed by immobilized Lipozyme[®] CalB lipase in a solvent-free system. **Catalysis Today**, v. 255, p. 49-53, 2015.
- MORAN, H. B. T.; TURLEY, J. L.; ANDERSSON, M.; LAVELLE, C. L. Immunomodulatory properties of chitosan polymers. **Biomaterials**, v. 184, p. 1-9, 2018.
- MUSTAFA, A.; NIKURA, F. Green synthesis of isopropyl palmitate using immobilized *Candida antarctica* lipase: Process optimization using response surface methodology. **Cleaner Engineering and Technology**, v. 8, p. 100516, 2022.
- MUTLU, V. N.; YILMAZ, S. Esterification of cetyl alcohol with palmitic acid over WO₃/Zr-SBA-15 and Zr-SBA-15 catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 522, p. 194-200, 2016.
- NAWONG, S.; OONSIVILAI, R.; BOONKERD, B.; HANSEN, L. T. S. Entrapment in food-grade transglutaminase crosslinked gelatin-maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus spp.* during exposure to simulated gastro-intestinal juices. **Food Research International**, v. 85, p. 191-199, 2016.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2011. v.6.

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. 85-86, p. 71-92, 2013.

NEVES, J. S.; SOUZA JR, F. G.; SUAREZ, P. A. Z.; UMPIERRE, A. P.; MACHADO, F. In situ production of polystyrene magnetic nanocomposites through a batch suspension polymerization process. **Macromolecular Materials Engineering**, v. 296, p. 1107-1118, 2011.

NIETO, S.; BERNAL, J. M.; VILLA, R.; GARCIA-VERDUGO, E.; DONAIRE, A.; LOZANO, P. Sustainable Setups for the Biocatalytic Production and Scale-Up of Panthenyl Monoacyl Esters under Solvent-Free Conditions. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v.11, p. 5737-5747, 2023.

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

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.

NOVAK, U.; LAVRIC, D.; ŽNIDARŠIČ-PLAZL, P. Continuous lipase B-catalyzed isoamyl acetate synthesis in a two-liquid phase system using Corning® AFR™ module coupled with a membrane separator enabling biocatalyst recycle. **Journal of Flow Chemistry**, v. 6, n. 1, p. 33, 2016.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p.123-130, 2013.

OLIVEIRA, F.; SOUZA, C. E.; PECLAT, V. R. O. L.; SALGADO, J. M.; RIBEIRO, B. D.; COELHO, M. A. Z.; VENÂNCIO, A.; BELO, I. Optimization of lipase production by *Aspergillus ibericus* from oil cakes and its application in esterification reactions. **Food and Bioprocess Processing**, v. 102, p. 268–277, 2017.

OH, W.K.; KIM, S.; KWON, O.; JANG, J. Shape-dependent cytotoxicity of polyaniline nanomaterials in human fibroblast cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, 4254-4260, 2011.

OKAY, O. Macroporous copolymer networks. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 6, p. 711–779, 2000.

ORTEGA-REQUENA, S.; BÓDALO-SANTOYO, A.; BASTIDA-RODRÍGUES, J.; MÁXIMO MARTÍN, M. F.; MONTIEL-MORTE, M.C.; GÓMEZ-GÓMEZ, M. Optimized enzymatic synthesis of the food additive polyglycerol polyricinoleate (PGPR) using Novozym® 435 in a solvent free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 84, p. 91-97, 2014.

ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; DOS SANTOS, J. C. S.; RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, A.; BRIAND, L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: the “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science & Technology**, V. 9, P. 2380-2420, 2019.

PARK, S.; KIM, S.H.; KIM, J.H.; YU, H.; KIM, H.J.; YANG, Y. H.; KIM, H.; KIM, Y.H.; HA, S.H.; LEE, S.H. Application of cellulose/lignin hydrogel beads as novel supports for immobilizing lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 119, p. 33-39, 2015.

PARQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 93-99, 2006.

PAYNE, C. M.; KNOTT, B. C.; MAYES, H. B.; HANSSON, H.; HIMMEL, M. E.; SANDGREN, M.; BECKHAM, G. T. Fungal cellulases. **Chemical Reviews**, v. 115, p. 1308-1448, 2015.

PEREIRA, A.D.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* p. 1-24, v.12, 2022.

PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. 31p. Trabalho de conclusão do curso (Graduação em Engenharia Biotecnológica) - Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2014.

PERI, S.; KARRA, S.; LEE, Y. Y.; E KARIM, M. N. Modeling intrinsic kinetics of enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*, v. 23, p. 626-637, 2007.

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

POZO, D. F. **Effect of mass transfer limitations on enzymatic reactions in microreactors: a model-based analysis**. 2015. 71p. Master's dissertation (Chemical Engineering) – Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Bélgica, 2015.

QI, H.; DU, Y.; HU G.; ZHANG, L. Poly(carboxybetaine methacrylate)-functionalized magnetic composite particles: A biofriendly support for lipase immobilization. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 2660-2666, 2018.

RANGEL, AMANDA B. S.; SILVA, MATEUS V. C.; DE ASSIS, GABRIELLE P.; ROSA, CÍNTIA M. R.; DOS SANTOS, JÚLIO C.; DE FREITAS, LARISSA. 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. 1, p. 1, 2022.

REN, K.; LAMSAL, B. P. Synthesis of some glucose-fatty acid esters by lipase from *Candida antarctica* and their emulsion functions. *Food chemistry*, v. 214, n. 1, p. 556, 2017.

REYES-REYES, A.L.; VALERO BARRANCO, F.; SANDOVAL, G. Recent Advances in Lipases and Their Applications in the Food and Nutraceutical Industry. *Catalysts*, v. 12, p. 1-24, 2022.

RICHETTI, A. **Esterificação Enzimática de Palmitato de 2-etilexila em Sistema Livre de Solvente**. 2009. 101p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, EQ/UFRJ, Rio de Janeiro, 2009.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; DOS SANTOS, J. C. S.; BERENQUER-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, p.746-770, 2019.

RODRIGUES, R. C.; BERENQUER-MURCIA, A.; CARBALLARES, D.; MORELLON-STERLING, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of enzymes via immobilization: Multipoint covalente attachment and other stabilization strategies. *Biotechnology Advances*, v. 52, p. 1-37, 2021.

ROSENTHAL, A.; RAUCH, S.; EICHHORN, K-J.; STAMM, M.; UHLMANN, P. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Enzyme immobilization on protein-resistant PNIPAAm brushes: impact of biotin linker length on enzyme amount and catalytic activity. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 171, p. 351-357, 2018.

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. 130p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

- ROSA, C. M. R.; SILVA, M. V. C.; 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.1, p. 1-9, 2020.
- RUDIN, A.; CHOI, P. **Ciência e Engenharia de Polímeros**; tradução: Arlete Smille Marques. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2015.
- SALIHU, A; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 86-96, 2015.
- SANTOS, V. N. **Estudo cinético da copolimerização estireno-divinilbenzeno**. 2015. 127p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- SANTOS, J. C.; BUENO, T.; ROS, P. C. M.; CASTRO, H. F. Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, p. 956-961, 2007.
- SANTOS, M. P. F.; BRITO, M. J. P.; JUNIOR, E. C. S.; BONOMO, R. C. F.; VELOSO, C. M. Pepsin immobilization on biochar by adsorption and covalent binding and its application for hydrolysis of bovine casein. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, p. 1982-1990, 2019.
- SAY, R.; KEÇILI, R.; BIÇEN, Ö.; SISMAN, F. Y.; HÜR, D.; DENIZLI, A.; ERSÖZ, A.; A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1688-1692, 2011.
- SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, 2007.
- SCHUELLER, R.; ROMANOWSKI, P. **Conditioning Agents for Hair and Skin**, New York: Marcel Dekker, 1999. 398p.
- SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v.349, p. 1289-1307, 2007.
- SHELDON, R.; BRADY, D. Green Chemistry, Biocatalysis and the Chemical Industry of the Future. **ChemSusChem**, v.15, p. 1-20, 2022.
- SHENG, H.; TAO, Y.; CUI, C.; ZHANG, Y.; CHEN, B.; TIANWEI TAN, T. Synthesis of 2-ethyl hexanol fatty acid esters in a packed bed bioreactor using a lipase immobilized on a textile membrane. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, p. 44-50, 2015.
- SHULER, L. M.; KARGI, F. Immobilized enzyme system. In: SHULER, L. M.; KARGI, F. (Eds.). **Bioprocess Engineering Basic Concepts**. New Jersey: Prentice Hall, 2017. p. 57-104.
- SILVA, M. S.; MACEDO, L. C.; SANTOS, J. A. B.; NARAIN, N.; SILVA, G. F. Aproveitamento de Co-produtos da Cadeia Produtiva do Biodiesel de Mamona. **Exacta**, v. 8, n. 3, p. 279-288, 2010.
- SILVA, M.V.C. **Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado** 2017. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.
- 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, p. 169-181, 2018b.
- 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, p. 1329-1336, 2020.

- SILVA, M.V.C.; ROSA, C.M.R.; AGUIAR, L.G.; OLIVEIRA, P.C.; DE CASTRO, H.F.; FREITAS, L. Synthesis of isopropyl palmitate by lipase immobilized on magnetized polymer matrix. **Chemical Engineering and Technology**, v. s/v, p. 1-15, 2020.
- SILVA, M.V.C.; SOUZA, C. A. P.; OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; FREITAS, L. Isopropyl myristate continuous synthesis in a packed-bed reactor using lipase immobilized on magnetic polymer matrix. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, p. 12-20, 2018a.
- SIÓDMIACK, T.; HARALDSSON, G. G.; DULĘBA, J.; ZIEGLER-BOROWSKA, M.; SIÓDMIACK, J.; MARSZAŁŁ, M. P. Evaluation of Designed Immobilized Catalytic Systems: Activity Enhancement of Lipase B from *Candida antarctica*. **Catalysts**, v. 10, p. 876, 2020.
- SOONG, B.Y.; ONG, H.C.; LAU, H.L.N.; ISHAK, N.S.; ELFASAKHANY, A.; LEE, H.V. Production of sustainable two-stroke engine biolubricant ester base oil from palm fatty acid distillate. **Industrial Crops and Products**, v. 175, 2022.
- SORENSEN, T. H.; CRUYS-BAGGER, N.; WINDAHL, M. S.; BADINO, S. F.; BORCH, K.; WESTH, P. Temperature Effects on Kinetic Parameters and Substrate Affinity of Cel7A Cellobiohydrolases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 36, p. 22193-202, 2015.
- 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 & Technology**, v. 11, n. 17, p. 5696-5711, 2021.
- SREEHARSHA, N.; GHORPADE, R. V.; ALZHRANI, A. M.; AL-DHUBIAB, B. E.; VENUGOPALA, K. N. Immobilization studies of *Candida Antarctica* lipase B on gallic acid resin-grafted magnetic iron oxide nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 3235–3244, 2019
- 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, p. 1846-1859, 2013.
- STROBERG, W.; SCHNELL, S. On the estimation errors of KM and V from time-course experiments using the Michaelis-Menten equation. **Biophysical Chemistry**, v. 219, p. 17-27, 2016.
- SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P.; MENEGHETTI, M. R.; WOLF, C. R. Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química Nova**, vol. 30, n. 3, p.667-676, 2007.
- TAI, Y.; WANG, L.; GAO, J.; TAO, W.; HUO, J.; YANG, L. Synthesis of core/shell magnetic porous microspheres for lipase immobilization. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 22, p. 213-222, 2012.
- TANASKOVIĆ, S. J.; JOKIĆ, B.; GRBAVČIĆ, S.; DRVENICA, I.; PRLAINOVIĆ, N.; LUKOVIĆ, N.; KNEŽEVIĆ-JUGOVIĆ, Z. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 103-111, 2017.
- THEODORO, R. T. **Modificação química de resinas à base de estireno através do processo de sulfonação: estudo experimental e modelagem matemática**. 2018. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.
- TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. Cap.7. p. 337-357.

UPPENBERG, J.; TRIERHANSEN, M.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, p. 293-308, 1994.

URIOSTE, D.; CASTRO, M.; BIAGGIO, F. C.; CASTRO, H. F. D. Síntese de padrões cromatográficos e estabelecimento de método para dosagem da composição de ésteres de ácidos graxos presente no biodiesel a partir de óleo de babaçu. **Química Nova**, v. 31, n.2, p. 407-412, 2008.

VAKILI, F.; MOJTABAVI, S.; IMANPARAST, S.; KIANMEHR, Z.; FOROOTANFAR, H.; FARAMARZI, M. A. Immobilization of lipase on modified magnetic diatomite earth for effective methyl esterification of isoamyl alcohol to synthesize banana flavor. **3 Biotech**, v. 10, p. 447, 2020.

VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 23-39, 2013.

VESCOVI, V.; GIORDANO, R.L.; MENDES, A.A.; TARDIOLI, P.W. Immobilized lipases on functionalized silica particles as potential biocatalysts for the synthesis of fructose oleate in an organic solvent/water system. **Molecules**, v. 22, p. 1-16, 2017.

VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; GIORDANI, D. S.; DE CASTRO, H. F. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fúsel como matéria-prima. **Química Nova**, v. 40, n. 5, p. 541-547, 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 Bioenergy**, v. 119, p. 61-68, 2018.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 9, n. 4-6, p. 113-148, 2000.

Waghmare, G. V., Chatterji, A., & Rathod, V. K.; Kinetics of enzymatic synthesis of cinnamyl butyrate by immobilized lipase. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 183, p. 792-806, 2017.

WANG, S.; MENG, X.; ZHOU, H.; LIU, Y.; Secundo, F.; LIU, Y. Enzyme Stability and Activity in Non-Aqueous Reaction Systems: A Mini Review. **Catalysts**, v. 6, p. 32, 2016.

WANG, Y.; WANG, G.; MOITTESSIER, N.; MITTERMAIER, A. M. Enzyme Kinetics by Isothermal Titration Calorimetry: Allostery, Inhibition, and Dynamics. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v.7, 2020.

WEN-QIONG, W.; LAN-WEI, Z.; XUE, H.; YI, L. Cheese whey protein recovery by ultrafiltration through transglutaminase (TG) catalysis whey protein cross-linking. **Food Chemistry**, v. 215, p. 31-40, 2017.

WILTSCHI, B.; CERNAVA, T.; DENNIG, A.; CASAS, M. G.; GEIER, M.; GRUBER, S.; HABERBAUER, M.; HEIDINGER, P.; ACERO, E. A.; KRATZER, R.; LULEY-GOEDL, C.; MÜLLER, C. A.; PITZER, J.; RIBITSCH, D.; SAUER, M.; SCHMÖLZER, K.; SCHNITZHOFFER, W.; SENSEN, C. W.; SOH, J.; STEINER, K.; WINKLER, C. K.; WINKLER, M.; WRIESSNEGGER, T. Enzymes revolutionize the bioproduction of value-added compounds: from enzyme discovery to special applications. **Biotechnology Advances**, v.40, p.1-51, 2020.

WHITAKER, J. R. **Principles of enzymology for the food sciences**. New York: CRC Press, 1993.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **The Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 993-999, 2002.

XIANG, X.; SUO, H.; XU, C.; HU, Y. Covalent immobilization of lipase onto chitosan-mesoporous silica hybrid nanomaterials by carboxyl functionalized ionic liquids as the coupling agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 165, p. 262-269, 2018.

XIAO, Z.; HOU, X.; LYU, X.; ZHAO, J.; XI, L.; LI, J.; LU, J. R. Enzymatic synthesis of aroma acetoin fatty acid esters by immobilized *Candida antarctica* lipase B. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 8, p. 1671-1677, 2015.

YANAV, G. D.; MAGADUM, D. B. Kinetic modelling of enzyme catalyzed biotransformation involving activations and inhibitions. In: SENTURK, M. (Ed.). **Enzyme Inhibitors and Activators**. Rijeka: The Editor(s) and the Author(s), 2017. p. 73-124.

ZAAK, H.; FERNANDEZ-LOPEZ, L.; OTERO, C.; SASSI, C.; FERNANDEZ LAFUENTE, R. Improved stability of immobilized lipases via modification with polyethylenimine and glutaraldehyde. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 106, p. 67-74, 2017.

ZAGO, E.; JOLY, N.; CHAVERIAT, L.; LEQUART, V.; MARTIN, P. Enzymatic synthesis of amphiphilic carbohydrate esters: Influence of physicochemical and biochemical parameters. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. 1-11, 2021.

ZHANG, S.; GAO, H.; LI, J.; HUANG, Y.; ALSAEDI, A.; HAYAT, T.; XU, X.; WANG, X. Rice husks as a sustainable silica source for hierarchical flower-like metal silicate architectures assembled into Ultrathin Nanosheets for adsorption and catalysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 92-102, 2017.

ZHAO, X.; FENG QI, F.; YUAN, C.; DU, W.; LIU, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHENG, T.; FANG, J.; XIE, Q.; WU, Z.; LU, M.; XIA, F.; DENG, D.; NIE, Y.; JI, J. Measurement and correlation of the density, viscosity and vapor pressure of fatty acid 2-ethylhexyl esters. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 130, p. 243-250, 2019.