

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

MATEUS VINÍCIUS CASAGRANDE DA SILVA

Desenvolvimento de processos contínuos para a síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado: emprego de reatores de leito fixo, fluidizado e fluidizado estabilizado magneticamente

Lorena
2023

MATEUS VINÍCIUS CASAGRANDE DA SILVA

Desenvolvimento de processos contínuos para a síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado: emprego de reatores de leito fixo, fluidizado e fluidizado estabilizado magneticamente

Tese apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade da São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de concentração de desenvolvimento de produtos e processos.

Orientadora: Profa. Dra. Larissa de Freitas.

Versão Corrigida

Lorena

2023

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

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

Silva, Mateus Vinícius Casagrande da
Desenvolvimento de processos contínuos para a
síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada por
lipase imobilizada em copolímero magnetizado: emprego
de reatores de leito fixo, fluidizado e fluidizado
estabilizado magneticamente / Mateus Vinícius
Casagrande da Silva; orientadora Larissa de Freitas
Versão Corrigida. - Lorena, 2023.
138 p.

Tese (Doutorado 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. Lipase imobilizada. 2. Suporte magnetizado. 3.
Biorreator de leito fluidizado estabilizado
magneticamente. 4. Processo contínuo. 5. Éster
emoliente. I. Título. II. Freitas, Larissa de, orient.

*Dedico este trabalho a minha esposa e família,
pelo amor e apoio incondicional*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela minha vida, pelo amor, por iluminar meu caminho e ter me abençoado desde sempre.

À minha esposa, Daiane, pelo amor incondicional, carinho, paciência, zelo e compreensão.

À minha família: minha mãe, Telma, meu pai, Antônio, meu irmão, Rafael, meus avôs, Izildo (*in memoriam*) e Antônio, minhas avós, Alvina e Vera, por todo o amor e carinho que tiveram comigo e pelo apoio incondicional durante toda minha vida.

À Professora Dr^a. Larissa de Freitas, por ter me orientado durante todo meu trabalho e possibilitado o desenvolvimento do meu projeto, e também pela atenção, paciência, disponibilidade, confiança e pelos ensinamentos.

À Professora Dr^a. Heizir Ferreira de Castro (*in memoriam*) pelas contribuições, disponibilidade e apoio ao meu trabalho.

Ao Professor Dr. Pedro Carlos de Oliveira, ao Professor Dr. Leandro Gonçalves de Aguiar, ao Professor Júlio Cesar dos Santos, à Professora Dr^a. Patrícia da Rós e ao Professor Dr. Francisco Carlos Biaggio pelo apoio ao meu trabalho.

Aos meus amigos e amigas, Gustavo, Tainara, Jefferson, Jaíne, Alessandro, Rodrigo, Lucas, Leandro, Marcos, Verônica, Leonardo, Alex, Manoel, Maria Eduarda, Orerves, Mateus e Juliete pelo apoio que me deram durante toda a minha vida.

Aos companheiros de laboratório que me ajudaram durante todo meu trabalho, Felipe, Caio, Vinícius, Dr. Heitor, Dr^a.Ana Karine, Dr^a. Renata, Dr^a.Daniela e Dr. Cristiano.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Às demais pessoas, amigos e familiares, que apoiaram, torceram e contribuíram em tudo na minha vida.

RESUMO

SILVA, M. V. C. **Desenvolvimento de processos contínuos para a síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado:** emprego de reatores de leito fixo, fluidizado e fluidizado estabilizado magneticamente. 2023. 138p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver processos contínuos para a síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado empregando diferentes configurações de biorreatores, como reatores de leito fixo, fluidizado e fluidizado estabilizado magneticamente. O suporte utilizado para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) via adsorção física foi o poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado com Fe_2O_3 (STY-DVB-M). O biocatalisador apresentou atividade hidrolítica de 522,97 U g^{-1} (butirato de metila) e atividade sintética de 179,64 U g^{-1} (oleato de etila). Inicialmente, as reações de esterificação empregando ácido oleico e 2-etil-hexanol foram conduzidas em biorreator de leito fixo operado continuamente, sendo avaliada a influência do tempo espacial (3, 6 e 12 horas) e da razão molar (1:4 a 4:1 ácido:álcool) no rendimento de esterificação (%), na concentração (g L^{-1}) e produtividade em éster ($\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$). Os maiores rendimentos (80-85 %) foram obtidos quando se empregou excesso de reagente no meio reacional, tanto do álcool como do ácido. Entretanto, as maiores concentrações em éster (450-500 g L^{-1}) foram obtidas nos maiores tempos espaciais e em razões molares mais próximas de 1:1. As produtividades mais elevadas (50-57 $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) foram obtidas nos menores tempos espaciais e também nas razões molares mais próximas de 1:1. Assim, a condição experimental empregando-se razão molar 1:1 e tempo espacial de 12 h, foi selecionada como a mais adequada para a síntese do oleato de 2-etil-hexila nesta configuração. A síntese conduzida em biorreator de leito fluidizado foi realizada na razão molar de 1:1, sendo variado o tempo espacial (6, 12 e 18 h) e a porosidade do leito (0,866, 0,892 e 0,916). A condição experimental selecionada como a mais adequada para a síntese do éster emoliente nesta configuração foi a que empregou 12 h de tempo espacial e 0,892 de porosidade do leito, visto que apresentou elevada produtividade (0,73 $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$) e rendimento de esterificação satisfatório (48,24%). Posteriormente, foi desenvolvido o biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente utilizando a condição mais adequada do biorreator de leito fluidizado, sendo variada a intensidade do campo magnético em 5, 10 e 15 mT. Neste sistema experimental obteve-se um tempo de meia-vida do biocatalisador de 2148 h e produtividade de 0,850 $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$ com aplicação do campo de 15 mT. Os resultados deste trabalho demonstram que a lipase CALB imobilizada em STY-DVB-M foi bastante eficaz na síntese do éster emoliente oleato de 2-etil-hexila nas diferentes configurações de biorreatores avaliados. A utilização do biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente mostrou-se uma tecnologia bastante interessante para esta aplicação, pois apresentou maior produtividade em éster e estabilidade operacional, em relação aos outros sistemas experimentais testados, demonstrando possíveis vantagens econômicas no desenvolvimento do bioprocessamento.

Palavras-chave: Lipase imobilizada. Suporte magnetizado. Biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente. Processo contínuo. Éster emoliente.

ABSTRACT

SILVA, M. V. C. **Development of continuous processes for the synthesis of 2-ethyl-hexyl oleate catalyzed by lipase immobilized in magnetized copolymer:** using fixed bed, fluidized and magnetically stabilized fluidized reactors. 2023. 138p. Thesis (Doctoral of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2023.

The objective of the present work was to develop continuous processes for the synthesis of 2-ethyl-hexyl oleate catalyzed by lipase immobilized in magnetized copolymer using different bioreactor configurations, such as fixed bed, fluidized and magnetically stabilized fluidized bioreactors. The support used for the immobilization of *Candida antarctica* lipase (CALB) via physical adsorption was poly(styrene-co-divinylbenzene) magnetized with Fe₂O₃ (STY-DVB-M). The biocatalyst presented hydrolytic activity of 522.97 U g⁻¹ (methyl butyrate) and synthetic activity of 179.64 U g⁻¹ (ethyl oleate). Initially, the esterification reactions using oleic acid and 2-ethylhexanol were conducted in a fixed-bed bioreactor operated continuously, and the influence of space time (3, 6 and 12 hours) and molar ratio (1:4 to 4 :1 acid:alcohol) in esterification yield (%), concentration (g L⁻¹) and ester productivity (mmol g⁻¹ h⁻¹). The highest yields (80-85%) were obtained when an excess of reagent was used in the reaction medium, both alcohol and acid. However, the highest ester concentrations (450-500 g L⁻¹) were obtained at longer space times and at molar ratios closer to 1:1. The highest productivities (50-57 mmol g⁻¹ h⁻¹) were obtained in the shortest space times and also in molar ratios closest to 1:1. Thus, the experimental condition using a 1:1 molar ratio and a space time of 12 h was selected as the most suitable for the synthesis of 2-ethyl-hexyl oleate in this reactor. The synthesis conducted in a fluidized bed bioreactor was carried out at a molar ratio of 1:1, with the space time (6, 12 and 18 h) and bed porosity (0.866, 0.892 and 0.916). The experimental condition selected as the most suitable for the synthesis of the emollient ester in this configuration was the one that used 12 h of space time and 0.892 of bed porosity, as it presented high productivity (0.73 mmol g⁻¹ h⁻¹) and satisfactory esterification yield (48.24%). Subsequently, the magnetically stabilized fluidized bed bioreactor was developed, using the most suitable condition of the fluidized bed bioreactor, the intensity of the magnetic field was varied at 5, 10 and 15 mT. In this experimental system, a biocatalyst half-life of 2148 h and productivity of 0.850 mmol g⁻¹ h⁻¹ were obtained with application of a 15 mT field. The results of this work demonstrate that the lipase CALB immobilized in STY-DVB-M was very effective in the synthesis of the emollient ester 2-ethyl-hexyl oleate in the different bioreactor configurations evaluated. The use of a magnetically stabilized fluidized bed bioreactor proved to be a very interesting technology for this application, as it presented greater ester productivity and operational stability, in relation to the other experimental systems tested, demonstrating possible economic advantages in the development of the bioprocess.

Keywords: Immobilized lipase. Magnetized support. Magnetically stabilized fluidized bed bioreactor. Continuous process. Emollient ester.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Principais métodos de imobilização de lipases.....	33
Figura 3.2 – Polimerização de um monômero vinílico utilizando AIBN como iniciador: a) decomposição do iniciador AIBN; b) Iniciação; c) Propagação e d) terminação.	40
Figura 3.3 – Esquema de reator para a polimerização em suspensão.	43
Figura 3.4 - Esquema representativo da formação do poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de estireno e divinilbenzeno.....	46
Figura 3.5 – Solenoide e suas linhas de indução do campo magnético.....	48
Figura 3.6 – Diagrama esquemático mostrando o momento magnético dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3} em magnetita (Fe_3O_4).	51
Figura 3.7 – Mecanismo de esterificação das lipases: a) Formação do primeiro composto intermediário; b) Formação do complexo acil-enzima; c) Formação do segundo composto intermediário; d) Liberação do éster e formação da forma original da enzima.....	56
Figura 3.8 - Reação de esterificação entre ácido oleico e 2-etil-hexanol para formação de oleato de 2-etil-hexila e água.....	60
Figura 3.9 – Tipos de biorreatores utilizados com enzimas imobilizadas.....	64
Figura 4.1 – Fluxograma ilustrativo das principais etapas que foram executadas para o desenvolvimento do trabalho.....	68
Figura 4.3 – Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico: a) Ácido oleico, b) Magnetita e c) Partícula de magnetita revestida com ácido oleico.....	71
Figura 4.4 – Aparato experimental utilizando para sintetizar o suporte de STY-DVB-M: 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; 6 – Entrada para o gás nitrogênio.....	73
Figura 4.5 – Suporte de STY-DVB-M seco.	73
Figura 4.6 – Derivado imobilizado embebido em heptano.	74
Figura 4.7 – Ilustração da reação entre sódio e 2-etil-hexanol para a síntese do 2-etil-hexóxido de sódio.....	75
Figura 4.8 – Ilustração da reação entre ácido oleico e cloreto de tionila.	75
Figura 4.9 – Ilustração da reação entre 2-etil-hexóxido de sódio e cloreto de octadec-9-enoílapara a síntese dooleato de 2-etil-hexila.....	75
Figura 4.10 – Esquema experimental utilizado para a destilação e purificação do padrão de oleato de 2-etil-hexila: 1 – Manta de aquecimento; 2 – Balão de fundo redondo; 3 – Termômetro; 4 – Condensador; 5 – Banho termostático.....	76
Figura 4.11 – Aparato experimental do biorreator de leito fixo para a síntese do éster oleato de 2-etil-hexila operado em modo contínuo. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 – Bomba peristáltica; 3 – Coluna de vidro; 4 – Banho termostático; 5 – Reservatório de produto.....	78
Figura 4.12 - Aparato experimental para biorreator de leito fixo de duplo estágio com coluna extratora de umidade. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 – Bomba peristáltica; 3 – Primeiro estágio de coluna de vidro; 4 – Banho termostático; 5 – Coluna extratora de água; 6 – Segundo estágio de coluna de vidro; 7 – Reservatório de produto.	79
Figura 4.13 – Aparato experimental do biorreator de leito fluidizado. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 e 3 – Bombas peristálticas; 4 – Coluna de vidro; 5 – Banho termostático; 6 - Reservatório de substrato do reciclo; 7 - Reservatório de produto.....	80

Figura 4.14 – Aparato experimental do biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 e 3 – Bombas peristálticas; 4 – Coluna de vidro envolta de solenoide; 5 – Banho termostatizado; 6 - Reservatório de substrato do reciclo; 7 - Reservatório de produto; 8 – Fonte variável de energia.	83
Figura 5.1 - Espectro obtido para o oleato de 2-etil-hexila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹ H): a) Sinais de deslocamento dos hidrogênios do carbono ligados ao oxigênio da carbonila referente ao álcool; b) Sinais de deslocamento dos hidrogênios do carbono (denominado carbono α) ligados ao grupo carbonila referente ao ácido.	90
Figura 5.2 – Espectro obtido para o oleato de 2-etil-hexila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³ C): a) Sinais de deslocamento do carbono da carbonila; b) Sinais de deslocamento do carbono ligado a carbonila referente ao álcool.	91
Figura 5.3 – Cromatograma obtido para quantificação do oleato de 2-etil-hexila.	93
Figura 5.4 – Aparato experimental utilizado para a síntese de oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fixo em simples estágio: 1) Banho termostatizado; 2) Reservatório de substrato; 3) Bomba peristáltica; 4) Coluna de vidro com biocatalisador; 5) Produto coletado.	95
Figura 5.5 - Rendimento de esterificação do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	95
Figura 5.6 - Concentração do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	97
Figura 5.7 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	98
Figura 5.8 – Estabilidade operacional da CALB-STY-DVB-M na síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em modo contínuo em biorreator de leito fixo.	100
Figura 5.9 – Aparato experimental utilizado na síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fixo em duplo estágio com coluna extratora: 1) Banho termostatizado; 2) Reservatório de substrato; 3) Bomba peristáltica; 4) Colunas de vidro com biocatalisador; 5) Coluna extratora com peneiras moleculares; 6) Produto coletado.	101
Figura 5.10 – Rendimento do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em duplo estágio empregando coluna extratora de água, utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	102
Figura 5.11 - Concentração do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em duplo estágio empregando coluna extratora de água, utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	102
Figura 5.12 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em duplo estágio empregando coluna extratora de água, utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	103
Figura 5.13 – Comparação do teor de umidade presente no efluente dos biorreatores de leito fixo em duplo estágio na síntese contínua do oleato de 2-etil-hexila empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	104
Figura 5.14 –Amostra do efluente coletado do biorreator de leito fixo, com destaque para a fase aquosa que se separou da fase orgânica.	105

Figura 5.15 – Aparato experimental utilizando no biorreator de leite fluidizado: 1 – Banho termostaticado; 2 – Reservatório de substrato; 3 – Bomba peristáltica para substrato; 4 – Coluna de vidro; 5 – Reservatório do reciclo do substrato; 6 – Bomba peristáltica para reciclo do substrato; 7 – Coleta do produto.....	109
Figura 5.16 - Rendimento de esterificação do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leite fluidizado empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.....	111
Figura 5.17 - Concentração do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leite fluidizado empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.	111
Fonte: próprio autor.	111
Figura 5.18 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leite fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.....	112
Figura 5.19 - Estabilidade operacional da CALB-STY-DVB-M na síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em modo contínuo em biorreator de leite fluidizado.	114
Figura 5.20 – Aparato experimental utilizando no biorreator de leite fluidizado:1 – Banho Termostaticado; 2 – Reservatório de Substrato, 3 e 6 – Bombas peristálticas, 4 – Solenoide; 5 – Coluna do Biorreator; 7 – Reservatório do reciclo; 8 – Fonte de alimentação; 9 – Coleta do Produto.	116
Figura 5.21 – Síntese do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR variando a intensidade do campo magnético: a) Rendimento de esterificação; b) Concentração em éster e c) Produtividade...	117
Figura 5.22 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR em função da intensidade do campo magnético e seus desvios padrões.....	119
Figura 5.23 – Estabilidade operacional do biocatalisador na síntese do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR empregando 15 mT de intensidade de campo magnético.....	121

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1- Formulação utilizada nas reações de polimerização.	72
Tabela 5.1 – Características do suporte STY-DVB-M e do biocatalisador CALB-STY-DVB-M.....	88
Tabela 5.2 – Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ¹ H.....	92
Tabela 5.3 – Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ¹³ C.....	92
Tabela 5.4 – Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do oleato de 2-etil-hexila.....	93
Tabela 5.5 – Valores médios de rendimento, concentração em éster e produtividade obtidos na síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fixo operado continuamente empregando CALB-STY-DVB-M com substratos em diferentes razões (4:1 à 1:4) ediferentes tempos espaciais (3-12 h).....	94
Tabela 5.6 – Altura do leito do biorreator de leito fluidizado em função da massa de biocatalisador e vazão empregadas.....	106
Tabela 5.7 – Porosidade do leito fluidizado em função da massa de biocatalisador e velocidade superficial do fluido.	107
Tabela 5.8 – Condições experimentais utilizadas no biorreator de leito fluidizado para avaliar a influência da porosidade do leito.	110
Tabela 5.9 - Valores médios de rendimento, concentração e produtividade em éster obtidos no MSFBR operado continuamente empregando CALB-STY-DVB-M em diferentes intensidades de campo magnético.	116
Tabela 5.10 – Influência da intensidade do campo magnético na produtividade do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR.....	118
Tabela 5.11 – Condição selecionada para cada tipo de biorreator empregado.....	122
Tabela 5.12 – Média do rendimento de esterificação, concentração em éster, produtividade em éster e tempo de meia-vida do biocalisador na condição selecionada como ideal para cada tipo de biorreator.	122

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 – Classificação das enzimas de acordo com a Comissão das Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).	29
Quadro 3.2 – Lipases disponíveis comercialmente.	31
Quadro 3.3 – Métodos de imobilização de enzimas, tipo de ligação, vantagens e desvantagens.	34
Quadro 3.4 – Classificação dos materiais utilizados para a imobilização de enzimas.	38
Quadro 3.5 - Utilização do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases.	47
Quadro 3.6 – Trabalhos que utilizaram polímeros magnetizados para imobilização de lipases empregando magnetita (Fe_3O_4).	54
Quadro 3.7 - Utilização do 2-etil-hexanol como matéria-prima para síntese enzimática de produtos de interesse industrial.	62

LISTA DE SIGLAS

ABIHPEC	Associação Brasileira da Ind. de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos.
AIBN	Azobisisobutironitrila.
CALB	Lipase de <i>Candida antarctica</i> (Tipo B).
EC	Comissão de Enzimas.
FBR	Biorreator de leite fluidizado.
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular.
K_d	Constante de desativação.
MFSB	Biorreator de leite fluidizado estabilizado magneticamente.
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de próton.
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono.
STB	Biorreator descontínuo de tanque agitado.
PBR	Biorreator de leite fixo.
PEG	Polietilenoglicol.
PVA	Álcool polivinílico.
STY-DVB-M	Poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	23
2 OBJETIVOS	26
3 REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1 Biotecnologia e competitividade	27
3.2 Enzimas.....	27
3.2.1 Lipase.....	30
3.2.1.1 Lipase de <i>Candida antarctica</i>	31
3.3 Imobilização de lipases	32
3.3.1 Técnicas de imobilização de enzima	32
3.3.1.1 Imobilização por adsorção física	34
3.3.1.2 Imobilização por ligação covalente	35
3.3.1.3 Imobilização por ligações cruzadas	35
3.3.1.4 Imobilização por aprisionamento/microencapsulamento.....	36
3.3.2 Suportes para a imobilização de enzimas	37
3.4 Polímeros	38
3.4.1 Técnicas de polimerização	41
3.4.1.1 Polimerização em massa	41
3.4.1.2 Polimerização em solução	42
3.4.1.3 Polimerização em suspensão.....	43
3.4.1.4 Polimerização em emulsão.....	44
3.4.2 Poli(estireno-co-divinilbenzeno).....	45
3.5 Magnetismo e Materiais Magnéticos.....	47
3.5.1 Tipos de magnetismos	49
3.5.2 Magnetita	52
3.6 Polímeros híbridos magnéticos	52
3.7 Ésteres	55
3.7.1 Esterificação mediada por lipases.....	56
3.8 Ésteres emolientes	58
3.8.1 Oleato de 2-etil-hexila	59
3.9 Matéria-prima	60
3.9.1 Ácido oleico	60
3.9.2 Álcool 2-etil-hexanol.....	61
3.10 Biorreatores	63

3.10.1 Biorreator de leito fixo (PBR).....	64
3.10.2 Biorreator de leito fluidizado (FBR).....	65
3.10.3 Biorreatores assistidos por campo magnético	66
3.10.3.1 Biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR ou MFBR).....	66
4 MATERIAIS E MÉTODOS	68
4.1 Materiais.....	69
4.2 Métodos Experimentais	69
4.2.1 Síntese do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M).....	69
4.2.1.1 Síntese da magnetita	70
4.2.1.2 Revestimento da magnetita com ácido oleico	70
4.2.1.3 Purificação do Azobisisobutironitrila (AIBN).....	71
4.2.1.4. Polimerização em suspensão	71
4.2.3 Imobilização da lipase de <i>Candida antarctica</i> (CALB) no suporte polimérico. 74	
4.2.4 Síntese do padrão cromatográfico do oleato de 2-etil-hexila	74
4.2.5 Síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M.....	76
4.2.5.1 Síntese do oleato de 2-etil-hexila realizada em biorreator de leito fixo (PBR).....	77
4.2.5.1.2 Estratégias para remoção da água formada nas reações de esterificação.....	78
4.2.5.2 Síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fluidizado (FBR) 79	
4.2.5.2.1 Testes de expansão do leito fluidizado.....	80
4.2.5.3 Síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR).....	82
4.3 Métodos de análises	83
4.3.1 Atividade sintética	83
4.3.2 Atividade hidrolítica	84
4.3.3 Rendimento de imobilização	84
4.3.4 Determinação do teor de umidade	85
4.3.5 Acompanhamento das reações de esterificação	85
4.3.5.1 Rendimento de esterificação	85
4.3.5.2 Concentração em éster.....	85
4.3.5.3 Produtividade	86
4.3.5.3 Estabilidade operacional do biocatalisador	86
4.3.6 Teste de Tukey	86

5 RESULTADOS	87
5.1 Características do suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e do biocatalisador desenvolvido	87
5.2 Estabelecimento do método de análise para determinação do teor do oleato de 2-etil-hexila	89
5.2.1 Caracterização do oleato de 2-etil-hexila por RMN ¹H e RMN ¹³C	89
5.2.2. Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação do oleato de 2-etil-hexila	92
5.3 Reações de esterificação conduzidas em biorreator de leito fixo	94
5.3.1 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fixo em simples estágio	94
5.3.1.1 Estabilidade operacional do sistema experimental empregando biorreator de leito fixo em simples estágio	99
5.3.2 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fixo em duplo estágio empregando coluna extratora de água	101
5.4 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fluidizado	105
5.4.1 Testes de expansão do leito fluidizado	106
5.4.2 Variação da porosidade do leito na síntese do oleato de 2-etil-hexila	108
5.4.3 Estabilidade operacional	113
5.5 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR)	115
5.5.1 Teste de Tukey	118
5.5.2 Estabilidade operacional do sistema experimental empregando biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR)	120
5.6 Comparação entre os principais resultados obtidos	121
6 CONCLUSÕES	124
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	126
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICE A	138

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ésteres emolientes são compostos 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 (CHAO *et al.*, 2018). O oleato de 2-etil-hexila é um éster emoliente bastante atrativo comercialmente devido a sua aplicação em cosméticos, fármacos, alimentos, lubrificantes, plastificantes, aditivos de tintas e indústrias químicas em geral (RAUT; SHAIKH; DARBHA, 2014; TANG *et al.*, 2022).

A maioria das indústrias produtoras de ésteres utiliza processos que empregam temperaturas elevadas (150-240°C) e catalisadores ácidos ou resinas de trocas iônicas. No entanto, esses processos geram produtos com qualidade inferior, que pode conter componentes agressivos para a pele e à saúde humana, sendo necessárias etapas posteriores de purificação, acarretando em um maior custo de produção (BASSO; SERBAN, 2019; CHEN; ARNOLD, 2020; KOVALENKO; PERMINOVA; BEKLEMISHEV, 2019).

Atualmente, a maioria dos compostos utilizados na produção de cosméticos é oriunda da indústria petroquímica, no entanto, percebe-se um aumento na demanda do mercado consumidor de cosméticos por produtos que tenham alta qualidade e pureza, que sejam preferencialmente de origem natural, que empregue tecnologia limpa e renovável, e esteja de acordo com as regulamentações exigidas (CHOI; HAN, KIM, 2015; FARIAS *et al.*, 2021; MONTIEL *et al.*, 2015).

Processos que utilizam lipases como biocatalisadores são muito atraentes pela gama de possibilidades de aplicação dessa enzima, pois ela pode catalisar reações de esterificação, hidrólise e interesterificação com extrema facilidade, obtendo produtos de qualidade superior e com alto rendimento. No entanto, algumas dificuldades são encontradas nesse tipo de processo, como por exemplo, a recuperação do biocatalisador, a insolubilidade da enzima em alguns meios reacionais e a instabilidade enzimática. Para solucionar este problema, a técnica de imobilização de enzima pode ser utilizada, visto que propicia diversos benefícios em relação à enzima livre, como o aproveitamento da propriedade catalítica por um maior período de tempo; a possibilidade de operação do processo de forma contínua, proporcionando assim maior controle das variáveis do bioprocessamento e a facilidade de separação do biocatalisador dos produtos e dos substratos não convertidos (ARIAEENEJAD *et al.*, 2019; TREVISAN, 2014; WU *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a aplicação da enzima lipase para a produção de ésteres é uma excelente alternativa, devido à obtenção de um produto mais puro, sem coloração e odores, que empregam condições amenas de temperatura (40-60 °C). Tais processos são classificados como "processos limpos" ou que utilizam a "química verde", atendendo às exigências do mercado consumidor contemporâneo (JAISWAL; RATHOD, 2019; KHAN; RATHOD, 2015). O desempenho e o rendimento da síntese de ésteres por meio de processos biocatalíticos dependem de uma série de fatores tais como: razão molar (ácido:álcool), pH, temperatura, concentração de biocatalisador, tipo de enzima, teor de água, tipo de suporte e método de imobilização utilizado (DOS SANTOS; MEIRELES; MARTÍNEZ, 2017).

Diversos materiais vêm sendo utilizados como suporte para a imobilização de enzimas, uma vez que não há um material ideal para todos os tipos de processos, pois cada sistema possui sua especificidade (BENTO *et al.*, 2017). Dentre estes, os híbridos poliméricos com partículas magnetizadas têm se mostrado bastante interessantes para esta aplicação, pois apresentam diversas vantagens como: a) Elevada área superficial específica, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas e maior interação com o meio reacional; b) Alto carregamento enzimático, tornando as enzimas mais estáveis e com atividades catalíticas mais elevadas; c) Facilidade de separação das partículas magnetizadas, devido à possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração; d) Facilidade de uso/reuso em reatores enzimáticos, devido à simplicidade de preparação e manuseio, além disso, possibilita a implementação de um sistema reacional de biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (HAJAR; VAHABZADEH, 2016; MARTÍNEZ *et al.*, 2022; TANG *et al.*, 2019).

Biorreator é um equipamento onde transformações bioquímicas são catalisadas por enzimas ou células microbianas, sendo os mais comumente utilizados, do tipo tanque agitado e leito fixo ou fluidizado. Destaque pode ser dado ao biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFB ou MFBR), que emprega células ou enzimas imobilizadas em suportes magnéticos, apresentando algumas vantagens, como menor queda de pressão no leito, alta eficiência de transferência de massa, redução das limitações de transferência de calor e facilidade de separação do biocatalisador pela utilização de um ímã (BÔA MORTE *et al.*, 2021; CHEN *et al.*, 2017; CUBIDES-ROMAN *et al.*, 2017; ZHOU; CHEN; YAN, 2014).

O presente trabalho visou sintetizar o éster emoliente oleato de 2-etil-hexila via esterificação direta, empregando como matéria-prima o ácido oleico e o álcool 2-etil-hexanol,

conduzida em biorreatores de leito fixo, leito fluidizado e leito fluidizado estabilizado magneticamente, em modo de operação contínua, utilizando como biocatalisador, a lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em suporte híbrido polimérico de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado com partículas de magnetita. Ressalta-se que não há relatos na literatura sobre a síntese do éster oleato de 2-etil-hexila, que empregue como matriz de insolubilização da lipase suporte magnetizado e que seja sintetizado em biorreatores operados continuamente e assistidos por campo magnético.

Os resultados desta tese foram publicados na forma de artigo científico em periódicos internacionais e estão apresentados no Apêndice A.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do trabalho foi sintetizar o éster emoliente oleato de 2-etil-hexila, a partir da catálise enzimática conduzida em reatores tubulares operados em modo contínuo (reator de leito fixo e fluidizado) e desenvolver um biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente, empregando como substrato o ácido oleico e o álcool 2-etil-hexanol por meio de reações de esterificação em meio isento de solvente.

Para esta finalidade foram conduzidas esterificações contínuas empregando a lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em partículas de copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) como biocatalisador, em diferentes configurações de reatores: biorreator de leito fixo em simples estágio e duplo estágio, biorreator de leito fluidizado e biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente.

O objetivo geral do trabalho foi atingido mediante a execução dos seguintes objetivos específicos:

- Síntezar das partículas de STY-DVB-M por polimerização em suspensão e co-precipitação de íons de Fe^{+2} e Fe^{+3} em meio alcalino;
- Imobilizar a lipase microbiana de *Candida antarctica* (CALB) no suporte de STY-DVB-M por adsorção física;
- Empregar o derivado imobilizado na catálise de reações de esterificação para a síntese do éster emoliente, oleato de 2-etil-hexila, utilizando ácido oleico e álcool 2-etil-hexanol, em biorreatores de leito fixo e fluidizado, em modo de operação contínuo;
- Empregar diferentes estratégias visando a remoção da água formada como subproduto na esterificação, como por exemplo, biorreator de leito fixo em duplo estágio com coluna extratora;
- Selecionar parâmetros operacionais ideais do bioprocesso contínuo, como: tipo de reator, razão molar entre os materiais de partida, tempo espacial, porosidade, vazão de reciclo e fluidização;
- Desenvolver um sistema operacional de biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente para sintetizar o oleato de 2-etil-hexila.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Biotecnologia e competitividade

Atualmente o mundo tem enfrentado diversos problemas ambientais, econômicos e sociais, e em função disso existe uma grande preocupação com as gerações futuras, principalmente com relação à sua segurança, saúde e futuro próspero. A produção industrial de produtos de interesse comercial por meio da biotecnologia tornou-se uma alternativa bastante atraente, por geralmente empregar condições amenas de processos, gerar menor quantidade de efluentes, menos tóxicos ou até mesmo atóxicos, reduzir o consumo de energia, utilizar matéria-prima renovável (fontes animais, vegetais e microbianas), podendo substituir alguns materiais produzidos por combustíveis fósseis e não-renováveis (LOKKO *et al.*, 2018; PESSÔA *et al.*, 2019).

Entretanto, muitos processos biotecnológicos precisam ser estudados e otimizados, considerando principalmente alguns fatores, tais como, tipo de substrato, custo da matéria-prima, condições de processo, produtividade e pureza. Alguns desses fatores são obstáculos dispendiosos para a manufatura desses produtos, tornando-os mais caros e pouco competitivos com os fabricados pelos métodos convencionais (PESSÔA *et al.*, 2019).

Assim, antes de um bioprocessamento ser implementado é necessário realizar um estudo detalhado das variáveis que influenciam a síntese do produto de interesse, bem como do tipo do biorreator ideal para o processo. Para as reações de esterificação catalisadas por lipase, as principais variáveis que influenciam a síntese são: razão molar (ácido:álcool), teor de umidade do meio reacional, temperatura, polaridade dos substratos e produtos e carregamento enzimático (STERGIOU *et al.*, 2013).

Há diversos tipos de biorreatores, os mais utilizados são: o de tanque agitado, o de leito empacotado e o de leito fluidizado. Para a seleção de um biorreator, devem ser avaliadas algumas características, tais como: modo de operação (contínuo ou descontínuo), tensão de cisalhamento, tipo de substrato, o custo do capital de investimento e das operações envolvidas no processo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

3.2 Enzimas

Enzimas são macromoléculas de proteínas (polipeptídios), sendo sua estrutura composta por uma sequência linear de α -aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Ao todo

existem 20 diferentes tipos de aminoácidos, sendo que cada tipo de enzima possui uma sequência de aminoácidos diferente e característica. A cadeia linear possui “dobras” que resultam na estrutura dimensional da enzima. O peso molecular das enzimas varia de 5.000 a 5.000.000 Da, sendo a maioria na faixa de 20.000-100.000 Da (BUGG, 2012).

São catalisadores biológicos, ou biocatalisadores, capazes de diminuir a energia de ativação das reações químicas, sem serem consumidos. Possuem elevado poder catalítico, acelerando as reações químicas geralmente em um grau maior que os catalisadores sintéticos e inorgânicos e possuem alta especificidade para os seus respectivos substratos (NELSON; COX, 2018; SAID; PIETRO, 2014).

Nos seres vivos as enzimas são as principais responsáveis pelos processos bioquímicos, catalisando diferentes etapas das várias reações que degradam ou sintetizam as moléculas dos nutrientes e/ou estruturais, geralmente sacarídeos, proteínas e lipídios, conservando e transformando a energia química, sendo necessárias em todos os sistemas vivos, tanto para a sobrevivência como para a reprodução (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; NELSON; COX, 2018).

Atualmente, 5000 enzimas já foram caracterizadas, porém somente 300 estão disponíveis comercialmente e são produzidas industrialmente. As enzimas podem ser classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam. A Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) designou que as enzimas seriam nomeadas pela adição do sufixo *-ase* ao nome de seus substratos. Entretanto para evitar ambiguidade quanto ao nome das enzimas, cada enzima recebeu um nome e quatro números. Para a classificação EC, o primeiro, o segundo, o terceiro e quarto números referem-se respectivamente, à classe da enzima; subclasse relacionada ao tipo de substrato ou tipo de grupo funcional que atua; subgrupo da subclasse que está relacionado a um grupo funcional particular envolvido na reação; e o número de indentificação deste subgrupo (ILLANES, 2008; SINGH *et al.*, 2020; YOO *et al.*, 2017). Como exemplo, a lipase de *Candida antarctica* é classificada como EC 3.1.1.3, por ser da classe hidrolase, subclasse lipase, atuar sobre ligações de ésteres carboxílicos, mais especificamente triglicerídeos. O Quadro 3.1 mostra a classificação das enzimas pela Comissão das Enzimas da União Internacional dos Bioquímicos.

Quadro 3.1 – Classificação das enzimas de acordo com a Comissão das Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

Número e classe	Principais subclasses	Tipo de reação	Exemplo
1. Oxido-redutases	Oxidases, oxigenases, peroxidases, desidrogenases	Transferência de elétrons (oxidação e redução)	$-\text{CH}_2\text{OH} \leftrightarrow -\text{CH}=\text{O}$ $-\text{SH} \leftrightarrow -\text{S}-\text{S}-$ $-\text{CH}_2\text{NO}_2 \leftrightarrow -\text{CH}=\text{O}$
2. Transferases	Glicosiltransferases, metiltransferases, transaldolases, transcetolases, alquiltransferases, transaminases, sulfotransferases, fosfotransferases,	Transferência de grupos funcionais	$-\text{CH}_3$ $-\text{CH}_2\text{OH}$ $-\text{CHO}$
3. Hidrolases	Esterases, lipases, glicosidases, proteases, sulfatases, fosfalases, aminoacilases	Reações de hidrólise de ligações covalentes	$-\text{COOR} \leftrightarrow -\text{COOH} + \text{ROH}$ $-\text{COSR} \leftrightarrow -\text{COOH} + \text{RSH}$ $-\text{CONH}_2 \leftrightarrow -\text{COOH} + \text{NH}_3$
4. Liases	Decarboxilases, aldolases, ketolases, hidratases, desidratases,	Reações de clivagem de ligações não-hidrolíticas	$\text{Etanol} \leftrightarrow \text{Eteno} + \text{água}$
5. Isomerases	Racemases, epimerases, isomerases	Reações de isomerização	$\text{Glucose} \leftrightarrow \text{frutose}$
6. Ligases	Sintetases, carboxilases	Formadoras de ligações: -C-O- -C-S- -C-N- -C-C-	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{COOR}$
7. Translocases	Translocadoras de hidrônio, translocadoras de cátions inorgânicos e seus quelatos, translocadores de ânions inorgânicos, translocadoras de aminoácidos e peptídeos, translocadoras de carboidratos e seus derivados, translocadoras de outros compostos	Translocação de íons e moléculas através de células e membranas	$\text{ATP} + \text{H}_2\text{O} + 4 \text{H}^+ (\text{lado } 1) \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i + 4 \text{H}^+ (\text{lado } 2)$

Fonte: Adaptado (SINGH *et al.*, 2020).

3.2.1 Lipase

Lipases são as enzimas responsáveis pela catálise da hidrólise de óleos e gorduras, além de catalisarem reações de esterificação, transesterificação e interesterificação, dependendo do tipo do substrato e das condições do meio no qual estão atuando. São encontradas em abundância na natureza, sendo obtidas na maioria das vezes a partir de fontes renováveis, estando presente nos animais, fungos, plantas e bactérias (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; SALIHU, ALAM, 2015).

São as hidrolases (EC 3.1.1.3) mais utilizadas para reações de síntese orgânica, em função da sua versatilidade, especificidade para substrato e estabilidade em solventes orgânicos. Atuam em condições amenas de temperatura, pressão e pH, não necessitam de cofatores e apresentam ampla quimiosseletividade, regioseletividade e esteroseletividade (ANDUALEMA; GESSESSE, 2012; TREVISAN, 2014).

O Quadro 3.2 mostra as principais lipases disponíveis comercialmente, bem como suas origens, fontes e as empresas que as produzem e/ou comercializam.

As lipases são muito atraentes para diferentes processos, devido a gama de possibilidades de aplicação dessa enzima, visto que ela pode catalisar diferentes tipos de reações com extrema facilidade, obtendo produtos de qualidade superior e com elevado rendimento. No entanto, algumas dificuldades são encontradas nesse tipo de processo, como por exemplo, a recuperação do biocatalisador, a insolubilidade da enzima em alguns meios reacionais e a instabilidade enzimática a certos pHs, temperaturas e solventes orgânicos. Para solucionar estes problemas, a imobilização de enzimas é uma técnica que pode ser utilizada, pois propicia diversos benefícios em relação à enzima na forma livre (TREVISAN, 2014).

Quadro 3.2 – Lipases disponíveis comercialmente.

Origem	Fonte	Empresas produtoras e/ou que comercializam
Fúngica	<i>Candida rugosa</i>	Advanced Enzyme Technologies Ltd., Amano, Atlas Biologics, Biocatalysts, Boehringer Mannheim, Meito Sangyo, Fluka Genzyme, Sigma
	<i>Candida antarctica A/B</i>	Advanced Enzyme Technologies Ltd., Boehringer Mannheim, Novo Nordisk, Sigma
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Novo Nordisk, Boehringer Mannheim
	<i>Rhizomucor miehei</i>	Novo Nordisk, Biocatalysts, Amano, Chr. Hansen
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Amano, Artechno S.A.
	<i>Geotrichum candidum</i>	Boehringer Mannheim, Novo Nordisk
	<i>Rhizopus sp.</i>	Yiming Biological ProductsCo. Ltd.
	<i>Aspergillus oryzae</i>	Suntaq International Ltd.
	<i>Aspergillus niger</i>	SunsonIndustry Group Company Limited
Bacterial	<i>Burkholderia cepacia</i>	Amano, Fluka, Boehringer Mannheim
	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	Gist-Brocades, Genencor International
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Genencor International
	<i>Chromobacterium viscosum</i>	Asahi, Biocatalysts
Animal	Porcine pancreatic lipase	Solvay pharma, Biocatalyst
	Calf, kidgoat e lamb	Chr. Hansen, Cleric-Sacco Group, Danlac Canada Inc.

Fonte: (SANDOVAL, 2018).

3.2.1.1 Lipase de *Candida antarctica*

Existem dois tipos principais de lipases de *Candida antarctica*, tipo A (CALA) e tipo B (CALB), sendo a CALB a mais empregada em reações de síntese. A CALB é uma lipase que apresenta alta enantiosseletividade e estereosseletividade, elevada estabilidade térmica e é muito resistente a solventes orgânicos (TANASKOVIĆ *et al.*, 2017).

A lipase CALB é extracelular, globular, com peso molecular de 33 kDa (317 aminoácidos), com dimensão de 30Å x 40Å x 50 Å, com ponto isoelétrico de 6,0. Possui conformação do tipo ‘aberta’ e seu sitio ativo possui a tríade catalítica de Serina-Histidina-

Aspartato (LIMA *et al.*, 2019; UPPENBERG *et al.*, 1994). Diferentemente da CALA, esta lipase não possui “*lid*” que regula o acesso ao sítio ativo e por isso não necessita de um mecanismo de ativação interfacial. No entanto, seu poder de catálise para a transesterificação e a hidrólise de triglicerídeos não é muito eficiente, comparado às outras lipases (LIMA *et al.*, 2019; MEHRASBI *et al.*, 2017; UPPENBERG *et al.*, 1994).

Em diversos estudos a temperatura ótima da lipase de *Candida antarctica* (CALB) para aplicação em reações de esterificação está na faixa de 50-60 °C, sintetizando ésteres com elevadas taxas de reação e com estabilidade operacional satisfatória (KIM *et al.*, 2019; VADGAMA; ODANETH; LALI, 2015a).

3.3 Imobilização de lipases

Enzimas imobilizadas são as que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço com retenção de sua atividade catalítica, podendo ser utilizada repetidamente e continuamente (GUISAN, 2020).

A imobilização visa à redução do custo global de um processo enzimático, visto que as enzimas imobilizadas oferecem vantagens em relação às solúveis, pois são mais estáveis termicamente; são facilmente separadas do meio reacional, possibilitando sua reutilização; além de permitirem a operação contínua do processo, facilitando um maior controle das variáveis do mesmo, visto que o biocatalisador é retido no interior do biorreator (ZANIN; MORAES, 2014).

A imobilização de lipases, entretanto, pode causar limitações de transferência de massa e em muitos casos a imobilização pode alterar a conformação da enzima e até mesmo desnaturá-la, reduzindo sua eficiência catalítica. Além disso, o custo do processo deve ser relativamente baixo, de modo que o balanço entre o custo da imobilização e a economia ao se reutilizar a enzima, seja favorável (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

3.3.1 Técnicas de imobilização de enzima

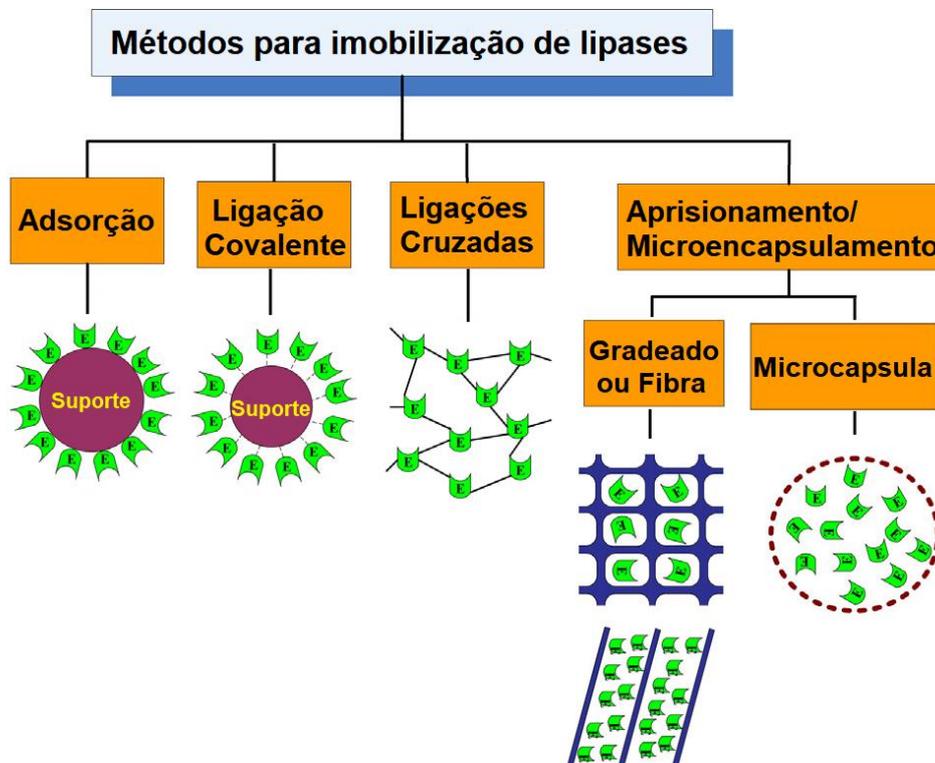
As enzimas podem ser imobilizadas por duas maneiras diferentes: 1) no interior de um suporte por meio da encapsulação e/ou aprisionamento e 2) na superfície de um suporte por meio de adsorção física reversível, ligações iônicas ou covalentes. Para escolher um método de imobilização adequado, bem como sua robustez, devem ser observadas as condições do processo no qual o biocatalisador será aplicado, como por exemplo, o tipo de reação (que

pode ser de hidrólise ou condensação), o sistema de reação (homogêneo ou heterogêneo), o meio reacional (hidrofóbico ou hidrofílico), o tipo de substrato e o custo da imobilização (CAO, 2006).

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a imobilização de lipases, podendo ser classificados como métodos físicos, destacando-se a imobilização por adsorção e o aprisionamento/microencapsulação, ou como métodos químicos, como a imobilização por ligação covalente e ligações cruzadas. Além disso, os métodos podem ser classificados como reversíveis, quando existe a possibilidade de separação e recuperação do suporte, dentre eles estão a adsorção física e a quelação, e irreversíveis, quando não é possível separar e recuperar o suporte, dentre eles podem ser citados a ligação covalente, aprisionamento e ligações cruzadas (GUISAN, 2020).

A Figura 3.1 ilustra os principais métodos utilizados para imobilização de lipases. O Quadro 3.3 mostra os métodos de imobilização de enzimas mais utilizados, tipo de ligação, suas vantagens e desvantagens.

Figura 3.1 - Principais métodos de imobilização de lipases.



Fonte: Modificado (ZHAO *et al.*, 2015).

Quadro 3.3 – Métodos de imobilização de enzimas, tipo de ligação, vantagens e desvantagens.

Métodos e tipo de ligação	Vantagens	Desvantagens
Adsorção física – ligações fracas: hidrofóbicas, Van der Waals ou interações iônicas	Simplicidade e baixo custo. Pouca alteração na conformação das enzimas	Dessorção
Ligações covalentes – ligações químicas covalentes entre grupos funcionais das enzimas e dos suportes	Não há lixiviação das enzimas. Pode estabilizar algumas enzimas	Não há como recuperar o suporte. Perda de atividade catalítica
Ligações cruzadas – as moléculas das enzimas estão ligadas entre si por meio de reagente funcional	Estabilização do biocatalisador	Não são usuais para biorreatores de leito fixo. Limitações de transferências de massa. Perda de atividade
Aprisionamento/microencapsulação – oclusão da enzima dentro de uma matriz	Pode ser aplicado em uma grande variedade de enzimas	Limitações de transferências de massa. Lixiviação das enzimas.

Fonte: Modificado (GUISAN, 2020).

3.3.1.1 Imobilização por adsorção física

A imobilização por adsorção física é o método mais simples para se imobilizar enzimas. Neste método a enzima fica associada à superfície do suporte por meio de interações hidrofóbicas, iônicas, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals. O processo ocorre em condições amenas e em alguns casos, a imobilização pode ser realizada juntamente com a purificação, sem que ocorra alterações na conformação da enzima, preservando sua atividade catalítica (GUISAN, 2020).

Para o sucesso deste tipo de imobilização, algumas variáveis devem ser otimizadas como, pH, temperatura, tipo de solvente e concentração de enzima. Pode ser utilizada uma vasta variedade de suportes para a imobilização de enzimas, podendo ser de natureza orgânica ou inorgânica, tais como cerâmica, alumina, carvão ativado, polímeros, celulose, quitosana, bentonita, entre outros (DWEVEDI, 2016).

Dentre as vantagens deste método, destacam-se: a) o suporte não necessita de ativação; b) processo de baixo custo; c) possível recuperação do suporte; d) pouca ou nenhuma alteração da conformação da enzima; e) preservação da atividade catalítica da

enzima (DWEVEDI, 2016). Entretanto, na imobilização por adsorção física pode ocorrer a dessorção da lipase devido a alguns fatores que podem alterar o microambiente das enzimas como pH, temperatura, força iônica e elevada concentração de substrato, sendo necessário avaliar o meio no qual o biocatalisador será aplicado, objetivando-se o êxito do processo (DWEVEDI, 2016).

Devido às facilidades e baixo custo operacional, e por preservar a atividade catalítica da lipase, este método foi selecionado para a obtenção do biocatalisador utilizado para o desenvolvimento do presente trabalho.

3.3.1.2 Imobilização por ligação covalente

Na imobilização por ligação covalente, as enzimas são ligadas à matriz por meio de ligação covalente. Para isto, o suporte deve conter grupos reativos, ou em alguns casos, são utilizados agentes de ligação, que podem ser grupos aminos, amidas, hidroxila, carboxila, entre outros. As enzimas se ligam à matriz, por meio de reações químicas, podendo ser dediazotação, formação de base de Schiff, reação de alquilação, ligação peptídica, ligações de dissulfeto, entre outras. Essas ligações podem envolver aminoácidos que não estão no sítio ativo da enzima, levando a possíveis alterações conformacionais em sua estrutura, diminuindo sua atividade catalítica (DWEVEDI, 2016).

As matrizes utilizadas como suportes para este método podem ser de origem natural, como agarose, ou sintética, como polímeros à base de ácido metacrílico, estireno e acrilamida. No entanto, para selecionar a matriz adequada para uma determinada enzima, é necessário avaliar diversos parâmetros, como o custo, a disponibilidade, a capacidade de realizar ligações, a hidrofobicidade/hidrofilicidade, resistência mecânica e estabilidade operacional (GUISAN, 2020). Este método apresenta a vantagem de não perder parte da enzima imobilizada por lixiviação, em função do tipo de ligação entre enzima/suporte.

3.3.1.3 Imobilização por ligações cruzadas

A imobilização por ligações cruzadas, do inglês “*cross-linked enzyme aggregates*” (CLEA), envolve a formação de diversas ligações covalentes das moléculas de enzima entre si, a partir da utilização de agentes de ligação multifuncionais, tais como glutaraldeído, glioxal e diisocianato de tolueno. Geralmente, os grupos responsáveis pelas ligações são as aminas de lisina, hidroxilas fenólicas de tirosina e imidazol de histidina. Este método não

utiliza matrizes sólidas como suporte, pois as enzimas são ligadas entre si por meio de agentes de ligação (DWEVEDI, 2016).

As principais vantagens deste método são a sua simplicidade, a retenção da atividade catalítica enzimática e a simplificação das operações de purificação e imobilização das enzimas. Entretanto, pode haver perda de uma grande quantidade de enzima durante o processo de imobilização, visto que as ligações cruzadas não ocorrem de forma homogênea no meio. Além disso, o sistema imobilizado, por se tratar de uma macromolécula, pode apresentar dificuldades difusionais, acarretando menor atividade catalítica (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; DWEVEDI, 2016).

3.3.1.4 Imobilização por aprisionamento/microencapsulamento

No método de imobilização por aprisionamento, a enzima é envolvida por um material, podendo ser aprisionada por fibras, por confinamento físico em um polímero, ou no interior de um gel polimérico, de modo que permita a difusão do substrato e a liberação do produto, sem que ocorra o desprendimento da enzima (CAO, 2006).

Primeiramente a enzima é dispersa em uma solução contendo o material que a aprisionará, sendo posteriormente realizado o processo de solidificação, visando formar uma barreira física que manterá a enzima em seu interior. Esse processo pode ser realizado por meio de métodos químicos ou físicos, dentre os métodos químicos, destacam-se as ligações cruzadas e a polimerização, e dentre os métodos físicos, a gelificação, além da possibilidade da combinação desses dois tipos (CAO, 2006). Adicionalmente, neste método a enzima pode ligar-se quimicamente ou fisicamente ao suporte.

A imobilização por aprisionamento possui algumas vantagens tais como, simplicidade do processo, elevadas atividades catalíticas, devido à grande área superficial disponível para a imobilização por este tipo de método, não ocorrência da alteração na conformação enzimática e nem modificação química da enzima. No entanto, há diversas desvantagens associadas à este método, como por exemplo, só podem ser utilizados substratos/produtos de moléculas pequenas, a enzima pode se desprender da matriz, além da possibilidade dos problemas difusionais (DWEVEDI, 2016; CAO, 2006).

3.3.2 Suportes para a imobilização de enzimas

Diversos materiais podem ser utilizados como suportes para imobilização de enzimas, contudo devem ser selecionados baseados em uma série de critérios em relação às suas propriedades, aplicações e custo. Na maioria dos casos o suporte deve ser insolúvel no meio reacional, com hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade adequadas para a aplicação, apresentar elevada resistência química e à microrganismos, diâmetro de partícula e de poro adequados, alta área superficial específica, elevada resistência mecânica, fácil disponibilidade e baixo custo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

O diâmetro de poro do suporte deve ser suficientemente grande para acomodar as moléculas de enzima, proporcionando um biocatalisador com elevada atividade catalítica. Normalmente a maioria das técnicas de imobilização utilizam materiais com diâmetros de poro de 4 a 9 nm, contudo diâmetros de poro acima de 20 nm são os mais adequados, visto que minimizam as dificuldades difusionais dos substratos e produtos. Por outro lado, o aumento do volume de poros provoca um decréscimo na área superficial específica (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

As partículas dos materiais utilizados para a imobilização de enzimas devem possuir forma geométrica regular, de preferência esférica, e com baixa distribuição de tamanho de partícula. Essas características são fundamentais para aplicação em biorreatores de leito fixo e de leito fluidizado, visto que, o fluxo do fluido e a queda de pressão são fortemente dependentes dessas propriedades. Partículas muito pequenas e com elevada distribuição de tamanho, aumentam a queda de pressão nesses biorreatores (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; GUIBAN, 2020).

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua fonte de origem e estrutura química, conforme apresentado no Quadro 3.4.

Quadro 3.4 – Classificação dos materiais utilizados para a imobilização de enzimas.

Classificação	Tipo	Exemplos
Orgânico	Polímeros naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Polissacarídeos: celulose, agar, agarose, dextranas • Proteínas: colágeno, albumina • Carbono
	Polímeros sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Poli(estireno-co-divinilbenzeno) • Poliacrilatos • Polimetacrilatos • Poliamidas • Poliacrilamidas
Inorgânico	Minerais naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Bentonita • Sílica
	Materiais sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Vidro (com e sem poros controlados) • Metais • Óxidos metálicos com poros controlados

Fonte: (GUISAN 2020).

3.4 Polímeros

Polímeros são macromoléculas formadas por unidades repetitivas, chamadas de monômeros, que estão ligadas umas às outras por ligações covalentes. O termo polímero tem origem na língua grega, sendo que “*polýs*” significa muito, e “*mero*” significa parte, fazendo referência às várias unidades de repetição. Não há limite máximo para o número de unidades repetitivas, sendo estipuladas normalmente pela letra *n*, que também designa o grau de polimerização, porém macromoléculas compostas por poucos monômeros não são denominadas como polímeros, mas como oligômeros, do grego “*oligo*”, que significa poucos (FAKIROV, 2017; KOLTZENBURG; MASKOS; NUYKEN, 2017).

Os polímeros são amplamente produzidos industrialmente, sendo sua produção extremamente eficiente em relação ao gasto energético e rendimento de polimerização, assim como no tratamento de seus efluentes. Apresentam propriedades desejáveis para diversas aplicações, tais como, alta hidrofobicidade, elevada resistência química, alta resistência mecânica, baixa densidade e baixo custo, devido à escala de produção e à otimização do processo (YILMAZ, 2013).

Polímeros podem ser classificados como de origem natural ou sintética. Os naturais, também chamados de biopolímeros, na maioria das vezes são os compostos responsáveis pela existência e sobrevivência dos seres vivos, como por exemplo, as proteínas, os ácidos nucleicos, as fibras, os polissacarídeos, e até mesmo alguns elastômeros. Os polímeros sintéticos são normalmente obtidos a partir dos derivados da indústria petrolífera, dentre eles destacam-se os plásticos, que podem ser sintetizados a partir de vários tipos de monômeros, como o etileno, propileno e cloreto de vinila, estando presente na construção civil, indústria automotiva, utensílios domésticos, entre outras aplicações (CARRAHER JR., 2017).

A poliadição e a policondensação são os dois mecanismos de polimerização principais. A policondensação, também conhecida como polimerização em etapas, ocorre por meio de várias reações de condensação intermolecular de grupos reativos, como exemplo a esterificação, eterificação, amidação, gerando subprodutos como a água, ácido clorídrico, entre outros. Estas reações são reversíveis e muitas vezes sintetizam polímeros com menor peso molecular, em comparação à poliadição, necessitando de um catalisador e de temperaturas elevadas. No entanto, este mecanismo de polimerização sintetiza copolímero alternado, o que é bastante atrativo para determinadas aplicações (FAKIROV, 2017).

A poliadição, também conhecida como polimerização radicalar, ocorre por meio da adição de monômeros insaturados, em reação em cadeia, promovida por radicais livres. Em função dessas reações serem irreversíveis, não formam subprodutos (FAKIROV, 2017).

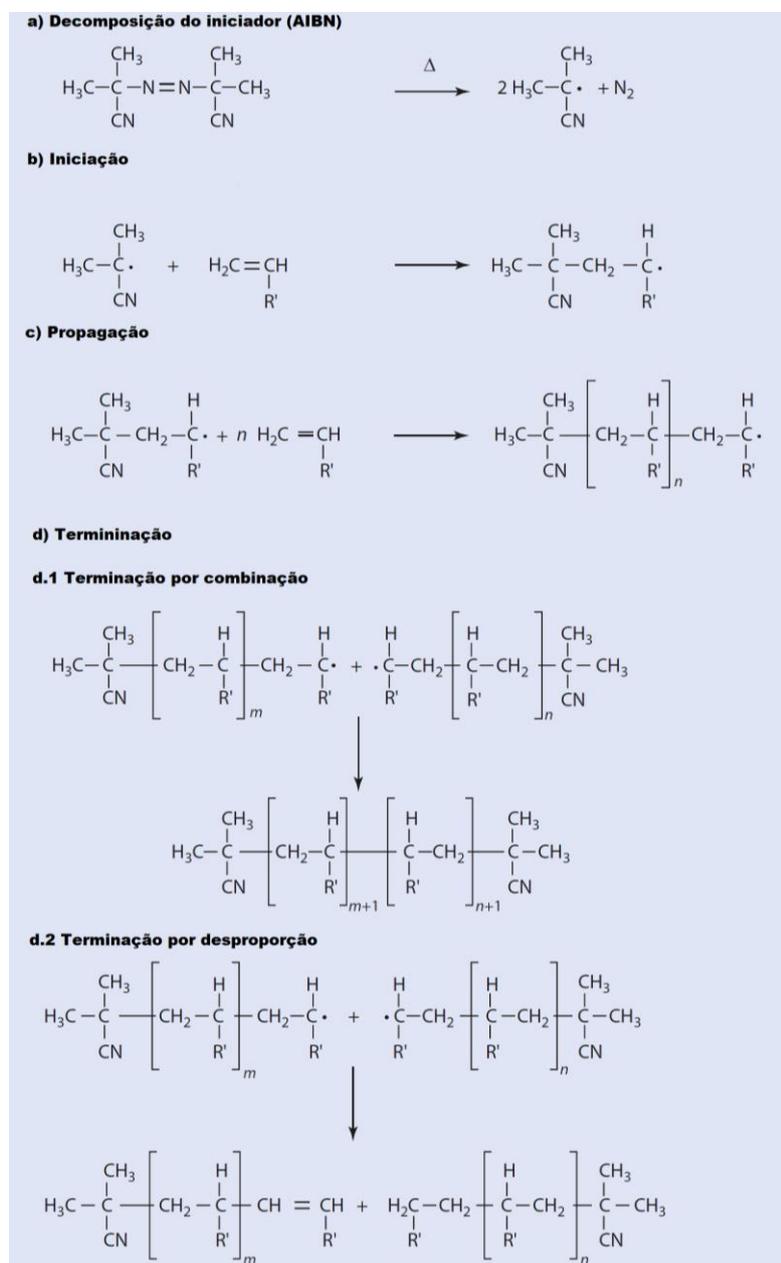
Este mecanismo envolve três etapas: iniciação, propagação e a terminação. Primeiramente o iniciador se decompõe em radicais livres, e a iniciação ocorre pelo ataque de um radical livre à uma insaturação de um monômero. Radical livre é uma substância que tem um elétron desemparelhado e é formada pela decomposição de um material, denominado iniciador. A propagação ocorre pelos novos radicais livres formados e pelos monômeros que foram atacados pelos radicais livres do iniciador, que vão atacando e adicionando outros monômeros em reação em cadeia, propagando a formação da molécula do polímero. Existem várias reações de terminação, a principal ocorre pela reação entre dois radicais livres que se encontram, neutralizando a propagação, podendo terminar na combinação das cadeias poliméricas (terminação por combinação), ou gerar uma insaturação em uma das cadeias poliméricas, sem combinar os dois polímeros (terminação por desproporção) (KOLTZENBURG; MASKO; NYUKEN, 2017; FAKIROV, 2017).

A transferência de cadeia é considerada uma quarta etapa no mecanismo de polimerização, sendo em muitos casos uma reação paralela indesejável ou uma etapa para controlar a massa molecular do polímero, por meio de um agente de transferência de cadeia.

Esta etapa é uma combinação das etapas de iniciação e terminação e ocorre pelo ataque de um radical livre de uma molécula que está em propagação a um próton de outra molécula, formando uma molécula com cadeia ramificada com radical livre, que pode sofrer propagação. A transferência de cadeia pode ser feita para um monômero, para um polímero, para um solvente, para um iniciador e para um inibidor (FAKIROV, 2017).

A Figura 3.2 mostra as etapas de iniciação, propagação e terminação de uma polimerização de um monômero vinílico e azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador.

Figura 3.2 – Polimerização de um monômero vinílico utilizando AIBN como iniciador: a) decomposição do iniciador AIBN; b) Iniciação; c) Propagação e d) terminação.



Fonte: Modificado (KOLTZENBURG; MASKO; NYUKEN, 2017).

De acordo com Koltzenburg, Maskos e Nyuken (2017), as propriedades dos materiais poliméricos podem variar de acordo com diversos fatores, dentre eles:

- Tipo do monômero;
- Ligações químicas entre os monômeros (Exemplos: éster, amidas, etc.);
- Grau de polimerização;
- Tipo de cadeia polimérica, podendo ser linear, ramificada ou reticulada;
- Presença de diferentes tipos de moléculas na cadeia polimérica (copolimerização);
- Sequência dos monômeros na copolimerização, podendo ser alternado ou em bloco;
- Interações específicas entre os componentes da cadeia polimérica (exemplos: ligações de hidrogênio e interações do tipo dipolo-dipolo).

De acordo com a necessidade de aplicação do polímero, deve-se selecionar a técnica de polimerização que forneça as propriedades mais adequadas e desejáveis. Dentre as técnicas mais utilizadas destacam-se a polimerização em massa, polimerização em solução, polimerização em suspensão e polimerização em emulsão (KOLTZENBURG; MASKO; NYUKEN, 2017).

3.4.1 Técnicas de polimerização

3.4.1.1 Polimerização em massa

Dentre todas as técnicas de polimerização, a polimerização em massa é a mais simples, sendo necessário somente o monômero(s), um iniciador que seja solúvel no monômero(s) e em alguns casos um agente de transferência de cadeia para controlar o peso molecular do polímero (CARRAHER JR., 2017).

As vantagens desta técnica são a elevada produtividade por volume de reator, visto que a massa de polímero não está diluída no solvente, fácil separação do produto, permitindo que a polimerização ocorra no próprio molde do produto final (polimerização *in situ*) (FRIED, 2014).

Uma das limitações desta técnica é a dificuldade de dissipar o calor produzido pela reação de polimerização, além disso, os polímeros apresentam baixa condutividade térmica e

alta viscosidade, principalmente em elevados rendimentos. Sob viscosidades elevadas os radicais poliméricos de cadeias maiores têm dificuldade de reagirem e terminarem, aumentando a quantidade de radicais livres no sistema reacional. Por outro lado, as pequenas moléculas de monômeros têm sua reação menos limitada em função da alta viscosidade, acelerando a velocidade de polimerização, pois as terminações vão diminuir de maneira mais acentuada que as propagações, aumentando a quantidade de calor liberada durante a polimerização, este fenômeno é chamado efeito gel (FRIED, 2014).

O problema da dissipação de calor pode ser minimizado pelo uso de impelidores especiais ou pela polimerização em diferentes tipos de reatores, ocorrendo em etapas, conforme o rendimento de polimerização, como por exemplo, a utilização de uma extrusora em condições de elevados rendimentos. Além disso, esta técnica apresenta dificuldade na remoção de eventuais traços de monômeros. Dentre os polímeros produzidos pela polimerização em massa, destacam-se o poliestireno, poli(metacrilato de metila) e o polietileno, sintetizados por mecanismos de poliadição (FRIED, 2014).

3.4.1.2 Polimerização em solução

Na polimerização em solução são utilizados iniciador, monômero(s) e solvente, devendo estes dois últimos ser solúveis entre si. O solvente deve possuir características aceitáveis de transferência de cadeia, ponto de ebulição e fusão adequados para as condições de polimerização e separação do produto final (FRIED, 2014).

Para a escolha de um solvente adequado para esta técnica, além das características já mencionadas, devem ser analisados alguns fatores como ponto de fulgor, toxicidade e custo. Água, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, ésteres, éteres e álcoois são alguns dos diversos compostos que podem ser utilizados como solvente (FRIED, 2014).

O controle da dissipação do calor e a menor viscosidade são algumas das vantagens apresentadas por esta técnica. Como desvantagem esta técnica possui baixa produtividade por volume de reator, devido a massa de polímero estar dissolvida em um solvente, além da necessidade de etapas de purificação para separar e recuperar o solvente do produto (RODRIGUEZ, 2014).

Diferentes polímeros podem ser sintetizados por meio desta técnica utilizando meio aquoso, com destaque para o poli(ácido acrílico), poliacrilamida, poli(álcool vinílico) e poli(N-vinilpirrolidinona). Dentre os monômeros que podem ser polimerizados em meio

solvente orgânico, destacam-se o Poli(metacrilato de metilo), poliestireno, polibutadieno, poli(cloreto de vinila) e poli(flúoreto de vinilideno) (FRIED, 2014).

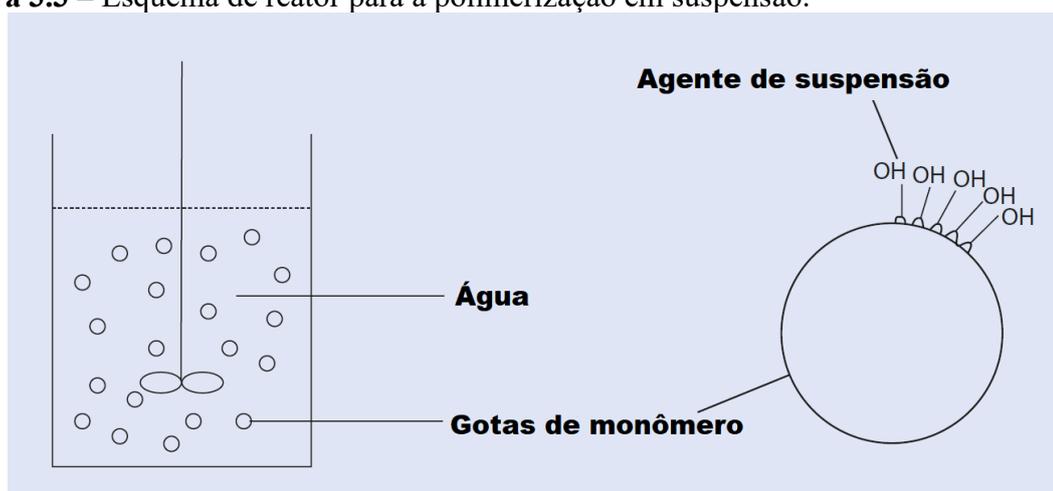
3.4.1.3 Polimerização em suspensão

Nesta técnica são necessários monômero(s), solvente, iniciador, agente de suspensão, normalmente álcool polivinílico, e em alguns casos, agente de transferência de cadeia, para controlar o peso molecular na polimerização radicalar. O iniciador deve ser solúvel no(s) monômero(s), formando a fase dispersa, e este insolúvel na fase contínua, geralmente água, que contém o agente de suspensão.

Para a polimerização, inicialmente é adicionada a fase contínua ao reator, em seguida esta fase deve ser agitada mecanicamente, e então adicionada a fase dispersa, formando pequenas gotas de monômero(s) com iniciador, envoltas e protegidas pelo agente de suspensão que evita a coalescência entre as gotas de monômero(s). A reação de polimerização ocorre em temperatura adequada, transformando as gotas de monômero(s) em pérolas ou contas de polímero, que são recuperadas por filtração e lavadas (RODRIGUEZ *et al.*, 2014).

A Figura 3.3 mostra um esquema de reator para a polimerização em suspensão, sendo as gotas de monômeros estabilizadas por álcool polivinílico.

Figura 3.3 – Esquema de reator para a polimerização em suspensão.



Fonte: Modificado (KOLTZENBURG; MASKO; NYUKEN, 2017).

Nesta técnica, pode-se adicionar à fase orgânica um solvente de alta afinidade e um de baixa afinidade, para que as pérolas sintetizadas tenham poros, aumentando a área superficial

específica destes materiais, sendo bastante atrativo para a aplicação como suporte de imobilização de enzimas (BENTO *et al.*, 2017; GARCIA-DIEGO; CUELLAR, 2005).

As principais vantagens desta técnica 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. Entretanto, a pureza do produto é relativamente menor, visto que pode apresentar traços de agente de suspensão e outros compostos que estabilizam a suspensão, podendo ser de difícil remoção. Além disso, o custo dos reatores para esta técnica costuma ser maior do que pela polimerização em solução (FRIED, 2014).

Dentre os polímeros sintetizados por esta técnica, destacam-se as resinas de troca iônica de poliestireno, poli(cloreto de vinila), poli(estireno-co-acrilonitrila), poli(cloreto de vinilideno-co-cloreto de vinila) e o poli(estireno-co-divinilbenzeno) (FRIED, 2014).

Essa técnica foi selecionada para ser utilizada neste trabalho, pois produz esferas de polímero poroso, que podem ser adequadas para a imobilização de enzimas, possibilitando o maior 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 (BENTO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018b).

3.4.1.4 Polimerização em emulsão

Para realização desta técnica são necessários água como fase contínua, monômero(s), iniciador solúvel em água, surfactante e um agente de transferência de cadeia. O(s) monômero(s) forma grandes gotas que são estabilizadas pelo surfactante, com a parte hidrofóbica da molécula voltada para as gotas e a parte hidrofílica voltada para a água. As micelas serão formadas se a concentração de surfactante estiver acima da concentração micelar crítica, sendo o tamanho das gotas dependentes da temperatura e do grau de agitação do meio reacional. Dependendo da natureza do surfactante, as micelas formam pequenas estruturas esféricas ou semelhantes a bastonetes (KOLTZENBURG; MASKO; NYUKEN, 2017).

Durante a polimerização em suspensão as gotas do monômero, que devem possuir pequena solubilidade em água, migram para o centro das micelas, sendo a polimerização iniciada quando o iniciador penetra na micela que contém o monômero. Como o número de micelas, geralmente 10^{18} por mL, é maior do que o número de gotas de monômeros, na faixa

de 10^{10} a 10^{11} por mL, estatisticamente o iniciador tem maior probabilidade de penetrar na micela, e com o prosseguimento da reação de polimerização o monômero migra das gotas para as micelas. Na faixa de 50 a 80 % de conversão de monômero, as gotas são esgotadas e as micelas são transformadas em partículas poliméricas relativamente grandes, apresentando diâmetros entre 0,05 e 0,2 μm . A emulsão de polímero na água é denominada látex, podendo ser utilizada desta forma como produto final, como por exemplo tintas látex, ou o polímero pode ser recuperado por meio de coagulação utilizando sais ou ácidos (FRIED, 2014). O poli(acetato de vinila) e o poli(acrilato de butila) são exemplos de polímeros sintetizados por esta técnica, sendo componentes de tintas látex (CARRAHER JR., 2017).

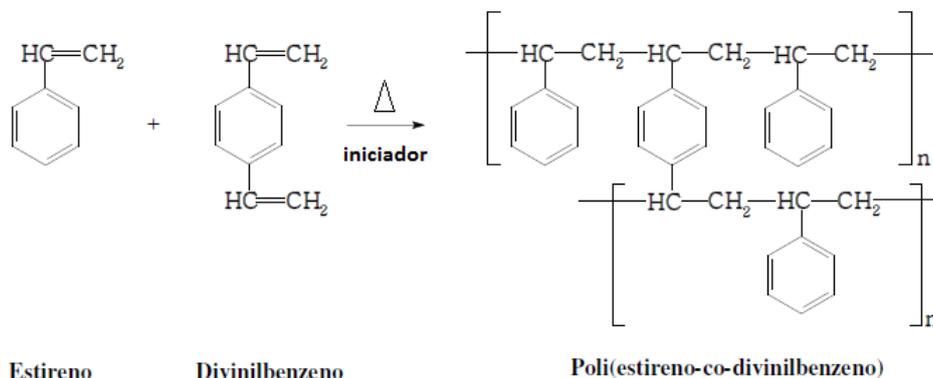
Quando o monômero é hidrofílico, a polimerização em emulsão ocorre por meio da técnica de emulsão inversa. Neste caso, o monômero, que normalmente está em solução aquosa, deve ser disperso num solvente orgânico utilizando um agente emulsificante de água em óleo (A/O), e o iniciador pode ser solúvel na água ou na fase orgânica. O produto final de uma polimerização em emulsão inversa é uma dispersão coloidal de um polímero em água na fase orgânica (FRIED, 2014).

A miniemulsão é uma variação da polimerização em emulsão, enquanto que no método convencional as gotas de monômeros possuem tamanho de 1 a 20 μm e as micelas de 10-20 nm, na miniemulsão as gotas de monômeros possuem tamanho similar ao das micelas, possuindo elevada probabilidade do iniciador migrar direto para as gotas de monômeros. Este efeito é conseguido por meio da utilização de álcoois graxos que aumentam a capacidade dos surfactantes para estabilizar as emulsões do tipo óleo em água. Nesta variação de método, é possível utilizar monômeros hidrofóbicos, visto que não é necessária a difusão do monômero para a micela por meio da fase aquosa (FRIED, 2014).

3.4.2 Poli(estireno-co-divinilbenzeno)

Poli(estireno-co-divinilbenzeno) é composto por monômeros de estireno e divinilbenzeno, obtido pelo método de polimerização em suspensão, apresentando partículas de tamanhos variados de acordo com a sua aplicação. Possui alto valor agregado e pode ser aplicado em separação cromatográfica, resinas de troca iônica e suporte para imobilização de enzimas (JAHANZAD; SAJJADI; BROOKS, 2005; LIMA, 2013). A Figura 3.4 ilustra a formação do poli(estireno-co-divinilbenzeno).

Figura 3.4 - Esquema representativo da formação do poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de estireno e divinilbenzeno.



Fonte: (BENTO, 2015).

O poli(estireno-co-divinilbenzeno) pode apresentar tanto características do tipo gel, sem poros permanentes e, portanto, ineficiente na adsorção de macromoléculas, como também, características do tipo macroporoso, com poros permanentes, podendo ser empregado em diferentes aplicações (GARCIA-DIEGO; CUELLAR, 2005; LIMA, 2013). Nesse último caso, o copolímero pode ser utilizado como suporte para imobilização de enzimas, devido a sua elevada área específica e diâmetro médio de poro, além do alto grau de hidrofobicidade, adequado para determinadas enzimas, como as lipases, facilitando a imobilização e permitindo um maior carregamento enzimático, em comparação com outros suportes utilizados para esta finalidade (BASSI *et al.*, 2016; GALAN-GARCIA *et al.*, 2014).

O Quadro 3.5 ilustra alguns exemplos de trabalhos que utilizaram o poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases, constatando que esse copolímero é adequado para esta aplicação.

Quadro 3.5- Utilização do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases.

Lipase	Método de imobilização	Produto de interesse	Referência
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção física	Biodiesel a partir de óleo de soja e etanol (transesterificação)	CASTIGLIONI <i>et al.</i> , 2016.
<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Adsorção física	Palmitato de isopropila a partir de ácido palmítico e isopropanol (esterificação)	BARSÉ <i>et al.</i> , 2018
<i>Candida rugosa</i>	Adsorção física	Diversos ésteres butílicos (esterificação)	SANTOS <i>et al.</i> , 2007.
<i>Candida rugosa</i>	Adsorção física	Butanoato de butila a partir de butanol e ácido butírico (esterificação)	BENTO <i>et al.</i> , 2017.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção física	Butirato de butila a partir de butanol e ácido butanoico (esterificação)	MARTINS <i>et al.</i> , 2013.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ligação covalente	Biodiesel a partir de óleo de canola e metanol (transesterificação)	DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2009.

Fonte: Próprio autor.

3.5 Magnetismo e Materiais Magnéticos

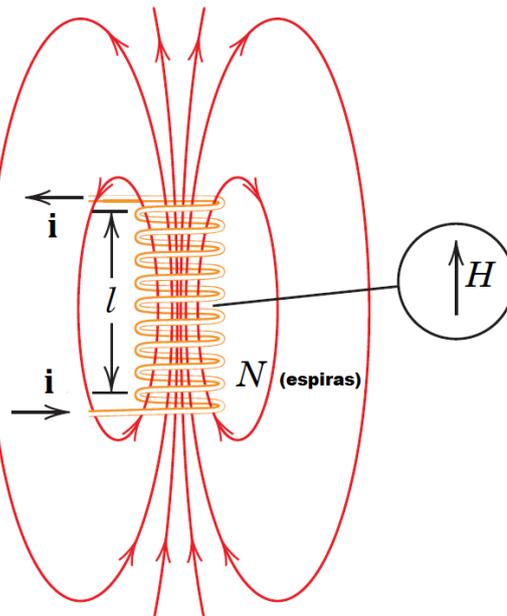
Magnetismo é o fenômeno no qual o material exerce uma força atrativa, ou repulsiva ou uma determinada influência em outros materiais. Entretanto, os princípios e os mecanismos subjacentes que explicam os fenômenos magnéticos são complexos (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

Forças magnéticas são geradas pelo movimento de partículas eletricamente carregadas, sendo conveniente pensar na força magnética como um campo magnético, onde linhas imaginárias de forças são traçadas para indicar a direção dessas forças em diferentes posições nas proximidades do campo. Dipolos magnéticos são encontrados em materiais magnéticos e em alguns aspectos são análogos a dipolos elétricos. Podem ser pensados como pequenos ímãs de barra compostos de pólos norte e sul, sendo seus momentos normalmente representados por setas (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

A utilização de solenoides é uma maneira simples muito utilizada para criar um campo magnético. O solenoide é composto por um fio, normalmente de cobre, enrolado em espiras, sendo submetido à uma diferença de potencial que gera uma corrente elétrica, e

consequentemente um campo magnético no interior deste solenoide (SERWAY; JEWETT JR., 2018). A Figura 3.5 mostra o exemplo de um solenoide e suas linhas de indução do campo magnético.

Figura 3.5 – Solenoide e suas linhas de indução do campo magnético.



Fonte: Modificado (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

A intensidade do campo magnético H do solenoide (em Am^{-1}) é calculada por meio da Equação 3.1, em que N é o número de espiras, l é o comprimento do solenoide (em metros m), e i é a intensidade da corrente (em amperes A) (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

$$H = \frac{N \cdot i}{l} \quad (3.1)$$

A magnetização (M) de um material pode ser calculada pela Equação 3.2, sendo χ_m a susceptibilidade magnética (adimensional), que é a capacidade que um material tem para se magnetizar sob a ação de um campo magnético externo (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

$$M = \chi_m \cdot H \quad (3.2)$$

Para calcular a densidade de fluxo magnético ou campo interno total, B (em Tesla T), utiliza-se a Equação 3.3, em que M é a magnetização do material (campo resultante devido à

presença de momentos de dipolo permanentes orientados e medida em $A.m^{-1}$) e μ_0 é a permeabilidade magnética no vácuo ($4\pi \cdot 10^{-7} H.m^{-1}$) (SERWAY; JEWETT JR., 2018).

$$B = \mu_0 \cdot (H + M) \quad (3.3)$$

As propriedades magnéticas de um material são devidas ao momento magnético dos elétrons em seus átomos e se originam das camadas eletrônicas parcialmente preenchidas nos átomos dos metais de transição. Destaque especial é dado aos metais de transição da série do ferro (elementos com o subnível 3d semi-preenchido): Fe, Co, e Ni, e os metais terras raras (elementos com o subnível 4f semi-preenchido), tais como, Nd, Sm, Gd e Dy (CULLITY; GRAHAN, 2008; LIU, 2006).

Há duas origens de momento magnético atômico, os associados com o momento orbital dos elétrons e os associados ao spin eletrônico. O momento magnético dos metais de transição da série do ferro com os não-metais (tais como óxidos Fe_3O_4 e NiO) são dados pelo spin eletrônico, e seu momento é igual ao número de spins desemparelhados (CULLITY; GRAHAN, 2008; LIU, 2006).

A maneira mais comumente utilizada para classificar as propriedades magnéticas dos materiais é com relação ao seu comportamento sob a ação de um campo magnético, podendo ser classificados como diamagnéticos, paramagnéticos, antiferromagnéticos, ferromagnéticos e ferrimagnéticos (JILES, 2015).

3.5.1 Tipos de magnetismos

Os materiais diamagnéticos são materiais que ao serem submetidos a ação de um campo magnético externo apresentam magnetismo com pouca intensidade e com sentido contrário (antiparalelo) ao campo aplicado. O magnetismo não é permanente e persiste enquanto o campo magnético existir, sendo este magnetismo atribuído principalmente à troca do movimento orbital dos elétrons que criam um momento magnético. A magnetização destes materiais é diretamente proporcional a intensidade do campo magnético externo aplicado, sendo a susceptibilidade magnética relativa fraca (em torno de 10^{-5}) e negativa. São classificados como materiais diamagnéticos alguns metais, como mercúrio, prata, zinco, ouro, a maioria dos não-metais, o silicone e o cloreto de sódio (CALLISTER; RETHWISCH, 2021; STEFANITA, 2012).

São classificados como paramagnéticos os materiais que possuem magnetização fraca e proporcional à intensidade do campo externo aplicado, sendo inversamente proporcional à temperatura do material. A susceptibilidade magnética relativa desses materiais está em torno de 10^{-3} a 10^{-5} . O magnetismo é atribuído aos spins desemparelhados de elétrons, sendo esses livres para mudar de direção (diferentemente do ferromagnetismo). Inicialmente a orientação dos momentos magnéticos é randômica, e ao aplicar um campo magnético externo, esses momentos tendem a alinhar-se na mesma direção do campo, destacando-se que em determinadas temperaturas os spins assumem orientações aleatórias devido à agitação térmica. São exemplos de materiais paramagnéticos: alumínio, sódio, titânio, zircônio, molibdênio (JILES, 2015; STEFANITA, 2012).

Os materiais diamagnéticos e paramagnéticos são considerados não-magnéticos, pois só exibem seu magnetismo na presença de um campo magnético externo (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

Antiferromagnetismo é um tipo de magnetismo, que ocorre devido aos arranjos ordenados de spins antiparalelos dos átomos vizinhos, fazendo com que o material não possua magnetização espontânea. Esses materiais possuem permeabilidades magnéticas baixas, sendo inversamente proporcional à temperatura, similarmente aos paramagnéticos, nas quais os spins dos elétrons, sob baixas temperaturas, são arranjados antiparalelamente, cancelando uns aos outros, resultando em susceptibilidades magnéticas extremamente baixas. Ao aplicar um campo magnético externo à esses materiais surge uma magnetização oposta ao campo magnético devido à interação entre os spins, provocando o desalinhamento dos spins vizinhos em diferentes sub-redes. O óxido de manganês é um exemplo de material antiferromagnético (CALLISTER; RETHWISCH, 2021; JILES, 2015).

Os materiais ferromagnéticos são aqueles em que a sua magnetização é diretamente proporcional ao campo magnético externo aplicado, atingindo a magnetização de saturação acima de uma determinada intensidade do campo magnético (STEFANITA, 2012). Possuem momento magnético permanente na ausência de um campo magnético externo.

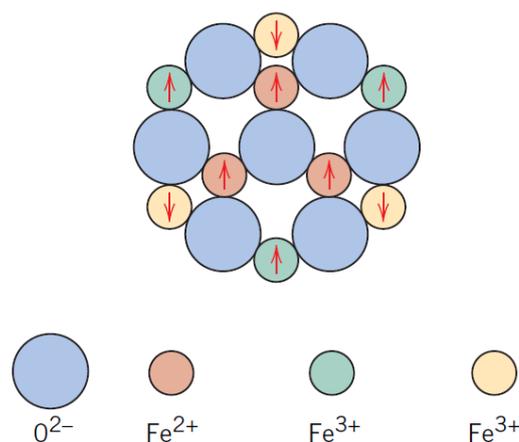
Conforme descrito anteriormente, o magnetismo desses materiais é explicado pelo alinhamento paralelo dos momentos magnéticos gerados pelas interações de troca. Os momentos magnéticos permanentes são devidos aos momentos magnéticos atômicos gerados pelos spins de elétrons que não são cancelados, e os momentos magnéticos orbitais são pequenos em comparação aos momentos dos spins, sendo a magnetização inversamente proporcional a temperatura, não possuindo magnetização espontânea acima da temperatura de Currie (T_c) tornando-se paramagnéticos (STEFANITA, 2012).

Alguns materiais ferromagnéticos possuem susceptibilidade magnética em torno de um milhão. São exemplos de materiais ferromagnéticos: ferro, cobalto, níquel, e alguns terras raras como o gadolínio (CALLISTER; RETHWISCH, 2021; JILES, 2015; STEFANITA, 2012).

O ferrimagnetismo é um tipo de ferromagnetismo que é muito similar ao antiferromagnetismo (STEFANITA, 2012). Nos materiais ferrimagnéticos, os íons estão alocados em duas ou mais sub-redes diferentes, sendo que alguns spins podem estar orientados em sentidos contrários aos spins de outros sítios, sendo muito similar ao antiferromagnetismo. Entretanto a magnetização de alguns dos sítios com spins paralelos ao campo aplicado é mais forte que a dos sítios com spins contrários, resultando em magnetização espontânea, muito similar ao ferromagnetismo. Acima da temperatura de Currie (T_c) estes materiais exibem comportamento paramagnético (JILES, 2015).

As ferritas, como a magnetita (Fe_3O_4), são os principais exemplos de materiais ferrimagnéticos. Este composto contém íons O^{2-} , Fe^{2+} e Fe^{3+} , sendo este último presente em quantidade duas vezes superior ao Fe^{2+} . Como os íons Fe^{3+} apresentam momentos magnéticos alinhados antiparalelamente entre si, esses momentos se cancelam, restando somente os momentos magnéticos do íon Fe^{2+} . A Figura 3.6 mostra a configuração da magnetita em relação aos seus momentos magnéticos (CALLISTER; RETHWISCH, 2021; JILES, 2015).

Figura 3.6 – Diagrama esquemático mostrando o momento magnético dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em magnetita (Fe_3O_4).



Fonte: (CALLISTER; RETHWISCH, 2021).

3.5.2 Magnetita

A magnetita foi o primeiro material magnético conhecido pelo homem, muito comum em rochas ígneas, no qual ocorre naturalmente na forma de óxido de ferro (Fe_3O_4). É o material mineral magnético mais comum, componente essencial da pedra-ímã, classificado como ferromagnético, contendo íons de ferro nos estados de oxidação $+2$ e $+3$ (COEY, 2010).

Atualmente a magnetita é utilizada como minério de ferro, cimento, toner (tinta), em ferrofluidos e para a produção de materiais híbridos magnéticos (COEY, 2010; CULLITY; GRAHAN, 2008). Pode ser sintetizada por diversas técnicas, tais como, a decomposição térmica redutiva, pelo método da pirólise sol-gel, pela técnica hidrotérmica, pela microemulsão e pela co-precipitação, sendo esta última a técnica mais difundida, devido ao seu baixo custo e à sua simplicidade e eficiência para a preparação de vários materiais de estado sólido de interesse. Esta técnica consiste na preparação de uma solução aquosa de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em uma solução básica, gerando as nanopartículas de óxido de ferro (BARRETO *et al.*, 2012; BENTO, 2017).

Nos últimos anos, partículas magnéticas compostas por óxidos de ferro, têm atraído muito interesse devido às suas propriedades multifuncionais, tais como, biocompatibilidade, superparamagnetismo, pequeno tamanho e baixa toxicidade (AISIDA *et al.*, 2011). Além disso, podem ser empregadas como matrizes para o preparo de biocatalisadores, devido sua facilidade de recuperação do meio reacional (GUISAN, 2020).

3.6 Polímeros híbridos magnéticos

Os compósitos magnéticos são formados basicamente por uma matriz polimérica e cargas magnéticas (geralmente obtidas a partir da magnetita). Apresentam forte propriedade magnética e baixa toxicidade, além de fácil obtenção. Compósitos magnéticos vêm obtendo destaque em diferentes aplicações nas áreas biomédica, física e biotecnológica, sendo muito utilizados para diagnósticos por imagem, imunoenaios, separação magnética de células, liberação controlada de fármacos e para imobilização de proteínas, enzimas e drogas (BENTO *et al.*, 2017; DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012).

Esses materiais apresentam diversas vantagens para a imobilização de enzimas, dentre elas: a) Elevada área superficial específica, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas e maior interação com o meio reacional; b) Elevado carregamento enzimático, tornando as enzimas mais estáveis e com maiores atividades biocatalíticas; c)

Baixa resistência à transferência de massa, fazendo com que as enzimas imobilizadas sejam mais estáveis e reativas; d) 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; e) Possibilidade de uso/reuso em reatores enzimáticos, devido a facilidade de manuseio (DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; VERMA; BARROW; PURI, 2013). Outra vantagem é sua utilização para aplicação em reatores de fluxo contínuo em leito fluidizado por meio da aplicação de um campo magnético externo (BRUNO; LIMA FILHO; DE CASTRO, 2008).

O Quadro 3.6 apresenta alguns trabalhos que utilizaram polímeros magnetizados para a imobilização de lipases. Este quadro mostra que polímeros magnetizados com diferentes composições estão sendo estudados por diversos pesquisadores com a finalidade de utilização como suporte de imobilização de lipases, com destaque para o poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, que apresentou bons desempenhos tanto na imobilização dessas enzimas, como na síntese de produtos de interesse comercial.

Quadro 3.6 – Trabalhos que utilizaram polímeros magnetizados para imobilização de lipases empregando magnetita (Fe₃O₄).

Matriz polimérica	Lipase	Resultados	Referência
Poli(alilglicidil éter-co-etilenoglicol dimetacrilato)	<i>Candida rugosa</i>	Foram sintetizados ésteres a partir de fitoesteróis e ácido linoleico, atingindo-se conversão de 93,5%.	ZHENG <i>et al.</i> , 2012.
Poli(metilmetracrilato-co-divinilbenzeno)	<i>Mucor javanicus</i>	O biocatalisador apresentou atividade de esterificação de 335,10 U.g ⁻¹ na síntese do oleato de glicerila e 95% de atividade catalítica residual após 30 ciclos.	MENG <i>et al.</i> , 2013.
Poli(ureia-uretano)	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	O desempenho do biocatalisador foi testado nas sínteses dos ésteres: oleato de etila, oleato de geranila e propionato de geranila, obtendo-se conversão total dos ácidos graxos em todas as sínteses.	CHIARADIA <i>et al.</i> , 2016.
Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	<i>Candida rugosa</i>	O desempenho do biocatalisador foi avaliado na síntese do butirato de butila em meio heptano, sendo obtida conversão total em algumas condições testadas.	BENTO <i>et al.</i> , 2017
Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	O biocatalisador foi empregado na síntese do miristato de isopropila, a partir da esterificação de ácido mirístico e isopropanol, conduzida em biorreator de leito fixo, atingindo rendimentos próximos de 100%.	SILVA <i>et al.</i> , 2018a
Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	<i>Burkholderia cepacia</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Foram sintetizados ésteres etílicos a partir da esterificação do óleo de coco e etanol, encontrando-se rendimentos próximos a 80%.	SILVA <i>et al.</i> , 2018b
Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	O biocatalisador foi empregado em um biorreator de leito fluidizado operado continuamente, na razão molar de substrato de 1:1, visando a síntese do oleato de 2-etil-hexila, sendo alcançada produtividade de 0,73 mmol g ⁻¹ h ⁻¹ .	SILVA <i>et al.</i> , 2020a
Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	<i>Candida Antarctica</i> (CALB)	O biocatalisador foi empregado em biorreator de leito fixo, em razões molares com excesso de um dos substratos na síntese do oleato de 2-etil-hexila, obtido rendimento de esterificação próximo de 90%.	SILVA <i>et al.</i> , 2020b
Poli(estireno-co-etileno glicol dimetacrilato)	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Foi sintetizado o éster butirato de butila, pela esterificação do ácido butírico com butanol, em meio isento de solvente, obtendo rendimento de esterificação de 56% sob temperatura de 55°C.	RANGEL <i>et al.</i> , 2022

Fonte: próprio autor.

3.7 Ésteres

Ésteres são compostos que quando hidrolisados convertem-se em álcool e ácido carboxílicos. São nomeados por meio de regras estabelecidas pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), que refletem o nome dos dois compostos, o ácido carboxílico e o álcool, que deram origem ao éster (KIRK-OTHMER, 2004).

São sintetizados majoritariamente pela reação entre ácido carboxílico e álcool, com formação de água como subproduto, estabelecendo um equilíbrio de reação, em que a água pode hidrolisar o éster, sendo necessário, em alguns casos, a retirada da água do meio reacional para deslocar o equilíbrio de reação para formação de produtos (princípio de L^e Chatelier). Entretanto também podem ser formados por outros tipos de reações utilizando anidridos ácidos, cloretos de ácidos, amidas, nitrilas, hidrocarbonetos insaturados, éteres, aldeídos, cetonas, alcóxidos e até mesmo outro éster (interesterificação) (KIRK-OTHMER, 2004).

São amplamente utilizados em produtos de limpeza, cosméticos, aromatizantes, lubrificantes, alimentos, surfactantes e até mesmo em fármacos, por isso são bastante atrativos comercialmente e produzidos em largas escalas (SAID; PIETRO, 2014).

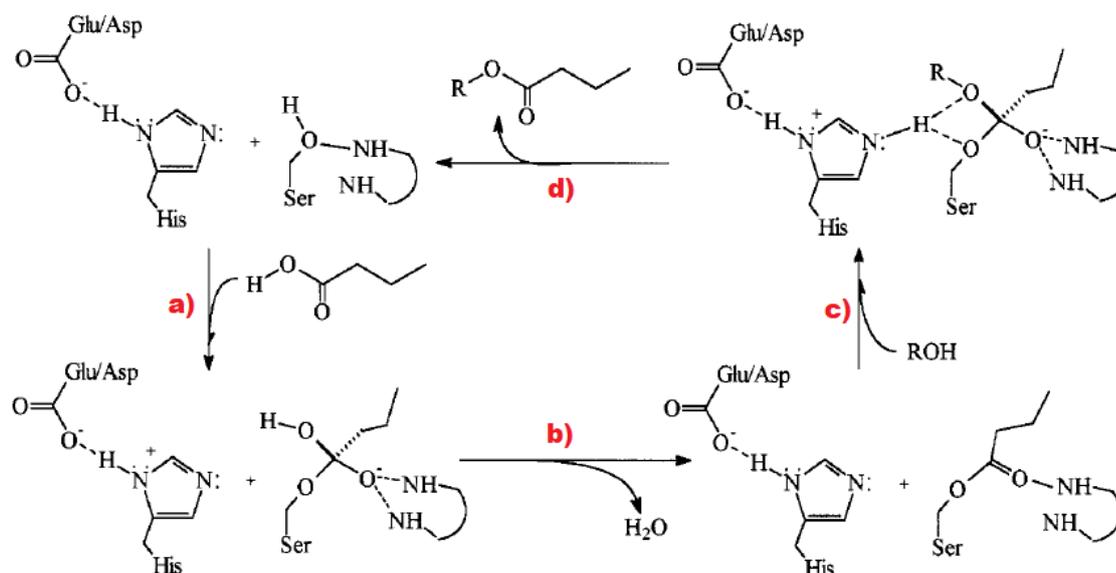
As sínteses de ésteres em larga escala são normalmente realizadas por processos químicos convencionais utilizando elevadas temperaturas (150-250°C) e sobpressão, visto que, em alguns casos, reagentes e/ou os produtos são voláteis, empregando-se catalisador geralmente composto por ácidos (ácido sulfúrico e ácido clorídrico) ou por resinas de troca iônica e zeólitas. Essas condições reacionais podem provocarreações paralelas indesejáveis, acarretando isomerização, polimerizaçãoe formação de outros compostos, como cloretos de alquila, resultando em um produto com odor e cor indesejáveis, sendo necessárias etapas de purificações (KIRK-OTHMER, 2004; KHAN; RATHOD, 2015).

Para contornar estes problemas, os ésteres podem ser sintetizados por meio de bioprocessos, empregando lipases como catalisadores, que atuam em condições mais amenas de temperatura e pressão. As lipases são estereosseletivas e regioseletivas, sintetizam produtos mais puros, evitando a formação de compostos que conferem coloração e odores. Tais processos são classificados como "processos limpos" ou que utilizam a "química verde", atendendo as exigências do mercado consumidor contemporâneo (KHAN; RATHOD, 2015).

3.7.1 Esterificação mediada por lipases

As lipases são capazes de esterificar ácidos graxos e álcoois com extrema facilidade. A esterificação acontece no sitio ativo da enzima que é composto pela tríade catalítica de aminoácidos, serina (ser), histidina (his) e aspartato (asp)/glutamato (glu), de acordo com Ghandi *et al.* (2000). O mecanismo de esterificação envolve dois compostos intermediários: a) o primeiro intermediário é formado pelo ataque nucleofílico do resíduo serina ao ácido carboxílico; b) em seguida esse intermediário libera água para formar o complexo acil-enzima; c) e então a molécula de álcool ataca esse complexo para formar o segundo intermediário; d) que libera a molécula de éster e a enzima volta a sua forma original. A Figura 3.7 ilustra o mecanismo de esterificação das lipases.

Figura 3.7 – Mecanismo de esterificação das lipases: a) Formação do primeiro composto intermediário; b) Formação do complexo acil-enzima; c) Formação do segundo composto intermediário; d) Liberação do éster e formação da forma original da enzima.



Fonte: (GHANDI *et al.*, 2000).

Nessas reações catalisadas por lipases, diversos fatores podem afetar a velocidade de reação, o rendimento de esterificação, a produtividade e a estabilidade operacional do processo, dentre eles:

- Temperatura: As reações de esterificação são realizadas na faixa de temperatura de 20-60 °C. Cada lipase tem a sua temperatura ótima, que depende do tipo de solvente e do substrato que a enzima irá atuar, fatores esses, que devem ser levados em consideração, visto

que interferem diretamente na estabilidade operacional do processo. Além disso, em temperaturas muito elevadas as lipases podem sofrer desnaturação e perder sua atividade catalítica, enquanto em baixas temperaturas a velocidade de reação tende a ser reduzida, devido a menor quantidade de choques efetivos (VADGAMA; ODANETH; LALI, 2015a).

- Quantidade de enzima: Normalmente uma maior quantidade de enzima empregada no meio reacional, acarreta um aumento na taxa de velocidade da reação e no rendimento. Este efeito é observado até um determinado ponto, sendo que a partir daí, o aumento da quantidade de enzima não altera significativamente a velocidade de reação, não sendo, portanto, economicamente viável, visto que as enzimas possuem custos elevados, por isso é fundamental otimizar o processo, tornando-o altamente produtivo (KIM *et al.*, 2019).

- Razão molar (ácido:álcool): este fator interfere diretamente no rendimento da reação, visto que pelo princípio de Le Chatelier, o aumento da proporção de um dos reagentes desloca o equilíbrio da reação para a formação de produtos. Entretanto, pode haver redução da produtividade, em função da diluição do produto no meio reacional pelos reagentes em excesso (KIM *et al.*, 2019).

- Polaridade dos substratos e solventes: quando muito polares, os solventes e os substratos podem reduzir a camada de hidratação da lipase, desnaturando-a e reduzindo o seu poder de catálise. Além disso, podem inibir a reação, reduzindo sua velocidade de síntese, devido à elevada afinidade pelo sítio ativo da lipase, impedindo o acesso às demais moléculas de substrato. O coeficiente de partição ($\log P$) é uma medida de polaridade muito utilizada para selecionar solventes, os mais adequados para esterificação empregando lipases, geralmente possuem $\log P$ maior que 4 (STERGIOU *et al.*, 2013).

- Quantidade de água: Como já foi mencionado, a reação de esterificação possui um equilíbrio de reação, que pode hidrolisar o éster dependendo da quantidade de água do meio reacional. Assim, são adotadas diversas estratégias para a remoção de água tanto do substrato quanto a formada durante a reação, como a utilização de vácuo e colunas extratoras. Entretanto, ressalta-se que as lipases necessitam de uma quantidade mínima de água para manter sua estrutura (água essencial) (FREITAS, *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2019; SILVA *et al.*, 2018a).

- Tipo de suporte: normalmente são preferíveis suportes hidrofóbicos por reterem menor quantidade de água em sua estrutura, visto que, suportes hidrofílicos podem modificar a interação entre o substrato e a quantidade de água essencial ao redor da enzima, limitando a migração para a fase sólida, ocasionando em menor atividade catalítica do biocatalisador (STERGIOU *et al.*, 2013; VILAS BÔAS *et al.*, 2018). Além disso, durante a imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos, as áreas hidrofóbicas próximas ao centro catalítico (*lid*) interagem com o suporte, expondo o sítio ativo, aumentando a afinidade da enzima com o substrato, mecanismo esse, conhecido como ativação interfacial (QI *et al.*, 2018).

3.8 Ésteres emolientes

A intensificação pelos cuidados estéticos, atualmente, alterou de forma marcante a indústria cosmética, devido à grande procura por produtos cosméticos. De acordo com a ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos), com base nos dados de 2021 e 2022, mesmo com recessão econômica global devido a pandemia, houve um crescimento de 3,5% na demanda neste período, tornando o Brasil o quarto maior mercado consumidor destes produtos (US\$ 26,9 milhões), o segundo maior mercado de fragrâncias, produtos masculinos e desodorantes, e o oitavo maior consumidor de produtos do tipo ‘*skin care*’ (ABIHPEC, 2023).

Além disso, no Brasil, no período de 2016 a 2022, houve um crescimento de 33,4% no consumo deste setor, que emprega 5,6 milhões de pessoas, sendo que no período de 2021 a 2022 houve um aumento de 9,6% das ofertas de oportunidades de trabalho nesta área, com destaque para o setor de exportação destes produtos, havendo exportações para 174 países (ABIHPEC, 2023).

Ésteres são muito utilizados nas formulações de produtos cosméticos, principalmente para o mercado *skincare*, pois apresentam inúmeras propriedades desejáveis para estes produtos. Dentre estas, podem ser citadas: emoliência, espalhabilidade, emulsificação, atuando como agente lubrificante, condicionador, umectante, plastificante, doador de brilho, formador de filmes, solubilizante e opacificante, além de proporcionar uma melhor consistência à formulação (CHAO *et al.*, 2018).

Ésteres emolientes são ésteres de ácidos graxos com cadeia longa, geralmente variando entre o láurico (C12:0) e o linoleico (C18:2). Essa limitação de números de carbonos na cadeia carbônica 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 *et al.*, 2015; SCHUELLER, ROMANOWSKI; 1999).

Quando aplicados à pele humana, os ésteres emolientes promovem a melhora da sua aparência, suavizando a pele ressecada. Além disso, esses ésteres são atóxicos, biodegradáveis, apresentam boa solubilidade em gordura e possuem excelente propriedade de molhabilidade. Por isso, são utilizados em várias formulações de diferentes produtos cosméticos, tais como condicionadores, hidratantes, loções, desodorantes, protetores solares e batons. Constituem cerca de 3 a 25 % em peso da composição do produto, sendo o segundo maior constituinte, já que a água é o primeiro (BAREL; PAYE; MAIBACH, 2014; KHAN *et al.*, 2015; LANZENDORFER, 2002).

Os ésteres emolientes refletem as propriedades de sua matéria-prima de origem (álcool e ácido carboxílico), que dependem do tamanho de sua cadeia carbônica, do grau de insaturações, das ramificações e da presença dos múltiplos grupos funcionais. Ésteres de ácidos graxos láurico (C12:0) e mirístico (C14:0) conferem sensação de leveza ao emoliente. Óleos líquidos ricos em ácidos graxos insaturados, como ácido oleico (C18:1), são responsáveis por fornecer uma propriedade hidratante ao cosmético. Com o aumento da cadeia carbônica aumenta-se o ponto de fusão, a viscosidade, a tensão superficial e a manutenção do produto na pele por um maior período de tempo, porém é diminuída a capacidade de espalhabilidade do emoliente (BAREL; PAYE; MAIBACH, 2014; CHAO *et al.*, 2018; IWATA; SHIMADA, 2013; SCHUELLER, ROMANOWSKI; 1999).

Ésteres emolientes ramificados, tais como ésteres etilhexílicos, possuem boa espalhabilidade, além de possuírem toque seco (não-oleoso), ou, dependendo do tipo, toque macio (BAREL; PAYE; MAIBACH, 2014).

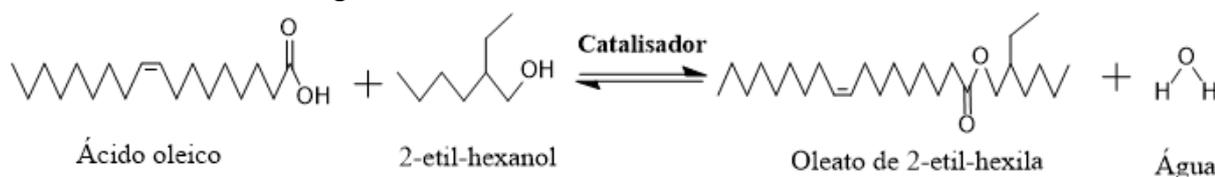
3.8.1 Oleato de 2-etil-hexila

O oleato de 2-etil-hexila é um éster emoliente, líquido em condições normais de temperatura e pressão, inodoro e incolor, de cadeia carbônica longa ramificada com um grupo etila, apresentando vinte e seis carbonos no total e uma insaturação. É bastante atrativo comercialmente devido à sua aplicação em cosméticos, fármacos, alimentos, lubrificantes, plastificantes, aditivos de tintas e indústrias químicas em geral (HE; CHEN; TAN; 2002; LACAZE-DEFURE; MOULOUNGUI, 2000; RAUT; SHAIKH; DARBHA, 2014; WYPYCH, 2017).

É um importante componente em formulações cosméticas de cremes e loções para produtos "*skincare*", "*hair care*", "*baby care*", bases de maquiagens, produtos para banho, e cremes suaves para limpeza de pele (HOLLIS, 2007).

A Figura 3.8 ilustra a formação do oleato de 2-etil-hexila por meio da reação de esterificação entre ácido oleico e 2-etil-hexanol.

Figura 3.8 - Reação de esterificação entre ácido oleico e 2-etil-hexanol para formação de oleato de 2-etil-hexila e água.



Fonte: Próprio autor.

3.9 Matéria-prima

Para o desenvolvimento do presente trabalho foi selecionada a síntese do éster emoliente oleato de 2-etil-hexila, a partir da esterificação direta do ácido oleico e 2-etil-hexanol. Dessa forma, julgou-se necessário apresentar algumas características/propriedades físicas e químicas desses materiais de partida para a obtenção do produto alvo desse estudo.

3.9.1 Ácido oleico

Ácido oleico é um ácido graxo insaturado, de cadeia carbônica longa, linear, com 18 carbonos e uma insaturação localizada no nono carbono da cadeia (ômega-9). É incolor, inodoro, líquido em condições normais de temperatura e pressão, sendo encontrado em abundância na natureza, principalmente na forma de triglicerídeos em óleos vegetais e gorduras animais, como por exemplo, no azeite de oliva e no óleo de amêndoa. É empregado para produção de surfactantes, plastificantes, couros, lubrificantes e ésteres, sendo utilizado como agente emulsificante na indústria alimentícia e farmacêutica, como solvente em fármacos, e na preparação de produtos cosméticos como sabões de banho, sabões líquidos e para limpeza da pele (NAGUIB; ZHANG, 2018; STEDMAN, 2013).

O ácido oleico é o ácido graxo encontrado em maior quantidade no tecido adiposo no ser humano, e por esse motivo, é muito utilizado em formulações cosméticas destinadas a aplicações na pele e nos cabelos, visto que geralmente não causa irritações, apresentando

propriedades hidratantes (IWATA; SHIMADA, 2013; MOREIRA; DE SOUZA; PIERRE, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

3.9.2 Álcool 2-etil-hexanol

Álcool 2-etil-hexanol é um álcool líquido em condições normais de temperatura e pressão, de cadeia carbônica média e ramificada com um grupo etila, composto por oito carbonos. É incolor, oleoso, com odor suave doce e levemente floral de rosas. Produzido em escala industrial para a aplicação em aromatizantes, fragrâncias, produtos de limpeza e como solvente, sendo miscível numa grande variedade de solventes orgânicos e insolúvel em água. É empregado na fabricação de plastificantes, tensoativos e herbicidas; utilizado como agente antiespumante, dispersante e molhante de pigmentos, além de atuar como matéria-prima para síntese de ésteres emolientes e biolubrificantes (KOHLPAINTNER *et al.*, 2011; MCGINTY *et al.*, 2010).

Este álcool é classificado como um álcool graxo, que são álcoois alifáticos que apresentam de 6-22 carbonos em sua cadeia, podendo ser linear ou ramificado, primário ou secundário, saturado ou insaturado (NOWECK; GRAFAHREND, 2011).

Quando um álcool graxo é utilizado em formulações cosméticas, seu grupo hidroxila característico permite um aumento da polaridade da sua molécula e das ligações de hidrogênio com a água, aumentando a sua consistência (CHAO *et al.*, 2018). Nessas formulações normalmente são empregados de 1 a 2 % em peso de álcoois para estabilizar a emulsão, além disso, podem conferir propriedades emolientes ao produto (CHAO *et al.*, 2018).

O álcool 2-etil-hexanol é amplamente utilizado como ingrediente de fragrância em diversos produtos cosméticos como xampus, sabonetes, fragrâncias finas e produtos de higiene pessoal, devidoas suas propriedades já mencionadas e por não causar danos à pele humana (MCGINTY *et al.*, 2010).

O Quadro 3.7 apresenta alguns trabalhos que utilizaram o 2-etil-hexanol para a síntese de ésteres emolientes por meio de esterificações catalisadas por lipases, demonstrando sua adequação para esta aplicação. Além disso, nota-se que a lipase de *Candida antarctica* (CALB) demonstrou rendimentos satisfatórios para a síntese de ésteres emolientes e biolubrificantes.

Quadro 3.7 - Utilização do 2-etil-hexanol como matéria-prima para síntese enzimática de produtos de interesse industrial.

Biocatalisador	Descrição do trabalho	Resultados	Referência
<i>Candida antarctica</i> imobilizada (Novozym 435)	2-etil-hexanoato de 2-etil-hexanol foi sintetizado por meio da reação de esterificação em meio hexano, empregando razão molar de 1:1 (ácido:álcool) e concentração de biocatalisador de 2 g L ⁻¹ .	Foi obtida 83% de conversão em 40 horas de reação. Também foi realizado um estudo cinético detalhado desta síntese.	DANESHFAR <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida antarctica</i> imobilizada (Novozym 435)	Palmitato de 2-etil-hexila foi obtido a partir da esterificação em sistema isento de solvente, empregando razão molar de 1:5,5 (ácido:álcool) e 10,5% de biocatalisador.	Foram realizados 10 ciclos de operação de 6 horas de reação, atingindo rendimentos de 85-100%.	LERIN <i>et al.</i> , 2011
Lipase de <i>Candida sp.</i> 99-125 imobilizada em tecido de algodão	Palmitato de 2-etil-hexila foi sintetizado a partir da esterificação em sistema isento de solvente, em reator contínuo de leito fixo, empregando razão molar de 1:1,3 (ácido:álcool).	Foram obtidos rendimentos superiores a 90%, durante as 300 horas de operação.	SHEN <i>et al.</i> 2015
Lipase Callera Trans L (<i>Thermomyces lanuginosus</i>)	Oleato de 2-etil-hexila foi sintetizado por meio da reação de esterificação em sistema isento de solvente, empregando razão molar de 1:1 (ácido:álcool) e 1% de biocatalisador.	Em 18 horas de reação obteve-se um rendimento de 53% para a produção do éster.	TRIVEDI <i>et al.</i> , 2015
<i>Candida antarctica</i> (CALB) imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno)	Oleato de 2-etil-hexila foi sintetizado a partir de meio isento de solvente empregando biorreator de leito fluidizado, sendo avaliada a porosidade do leito, o tempo espacial e a estabilidade operacional. Foi determinada a melhor condição experimental.	Foram obtidas elevadas produtividades, alcançando 0,73 mmol g ⁻¹ h ⁻¹ . Além disso, o sistema mostrou-se muito estável durante o período de operação.	SILVA <i>et al.</i> , 2020a
<i>Candida antarctica</i> (CALB) imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno)	Oleato de 2-etil-hexila foi sintetizado na reação de esterificação do ácido oleico e 2-etil-hexila, em biorreator de leito fixo, sendo avaliado o tempo espacial, razão molar e a estabilidade operacional. Foram selecionadas as melhores condições experimentais para a condução do bioprocessamento.	Os maiores rendimentos foram obtidos nos testes que empregaram excesso de um dos reagentes, atingindo cerca de 90%.	SILVA <i>et al.</i> , 2020b

Fonte: próprio autor.

3.10 Biorreatores

Biorreator é um equipamento onde transformações bioquímicas são catalisadas por enzimas ou células microbianas. A mistura reacional, constituída de meio (de cultivo ou para conversão enzimática) e agente biológico, é processada em condições adequadas para o agente biológico expressar o máximo de sua atividade catalítica, seja através do metabolismo da célula ou da reação enzimática (PEREIRA JR., 2008).

A princípio, enzimas na forma livre e solúvel só poderiam ser empregadas em reatores descontínuos, contudo, com o avanço das técnicas de imobilização, surge a possibilidade de utilizar outros tipos de reatores, inclusive os reatores de operação contínua (SCHMIDELL, 2021).

Os reatores bioquímicos são baseados nos reatores químicos tradicionais, porém com algumas modificações para otimizar a operação e a conversão dos reagentes. A seleção do tipo de biorreator a ser utilizado com enzimas imobilizadas depende da análise dos seguintes fatores: a) Forma da enzima imobilizada, que pode ser partículas, membrana ou fibras; b) Natureza do substrato (solução, sólidos em suspensão, coloidal); c) Requisitos operacionais da reação, tais como controle de pH e temperatura; d) Cinética da reação, inibição por substrato, produto, ou ambos; e) Superfície catalítica por unidade de volume de reator; f) Características de transferência de massa interna e externa; g) Facilidade de substituição do biocatalisador e sua regeneração; h) Facilidade de operação e i) Custo da construção do biorreator (ZANIN; MORAES, 2014).

Para o entendimento do sistema reacional e operacional de um reator é de fundamental importância distinguir tempo espacial de tempo de residência. O tempo espacial é uma medida que descreve a média do tempo que um elemento de fluido atravessa dentro do reator, desde sua entrada até sua saída, portanto, é uma medida da velocidade do fluido através do sistema em relação ao volume do reator. O tempo de residência é o período de tempo médio que uma substância específica permanece dentro do reator, normalmente utilizada para descrever a duração da permanência de reagentes, produtos ou contaminantes dentro do sistema (FOGLER, 2020).

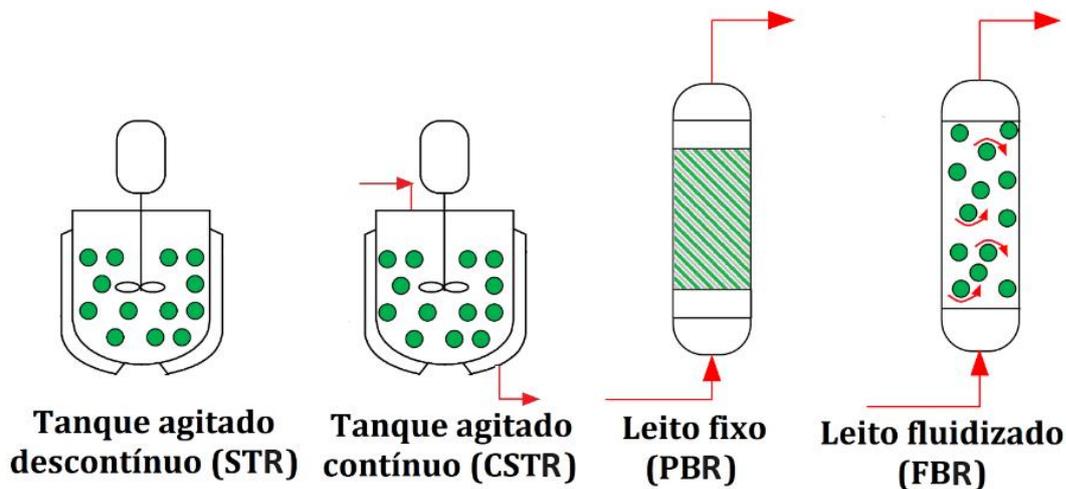
Os tipos de biorreatores mais comumente utilizados são: biorreator de tanque agitado, biorreator tubular de leito fixo ou fluidizado e biorreatores de membranas, sendo os tubulares os mais empregados por apresentarem condições de tensão de cisalhamento mais brandas. No entanto, em alguns processos pode ocorrer a combinação destes tipos reatores, sendo

realizadas experimentações e modelagens matemáticas para identificar a configuração ótima do processo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

A conversão adequada do substrato depende das seguintes condições: quantidade e atividade do biocatalisador (baseada na taxa máxima da velocidade de reação - V_{max}); o tempo de reação (t) ou tempo espacial (τ) e a concentração do substrato $[S]$ (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

A Figura 3.9 ilustra os principais tipos de biorreatores utilizados com enzimas imobilizadas.

Figura 3.9 – Tipos de biorreatores utilizados com enzimas imobilizadas.



Fonte: Próprio autor.

3.10.1 Biorreator de leito fixo (PBR)

Biorreator de leito fixo, do inglês “*Packed-bed bioreactor*” (PBR), é um sistema reacional no qual células ou enzimas estão imobilizadas e empacotadas em uma coluna, estando fixas e estacionárias, enquanto o substrato é bombeado através do leito. Este tipo de biorreator é amplamente utilizado em reações catalíticas em larga escala, devido a sua alta eficiência, baixo custo de operação e facilidade de construção (AGUIEIRAS; CALVACANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; AMINI *et al.*, 2017). Esse sistema possui algumas vantagens, tais como: alta conversão por unidade de massa de biocatalisador, devido ao grande contato entre o substrato líquido e o biocatalisador sólido; evita a quebra do biocatalisador devido a baixa tensão de cisalhamento; apresenta elevada razão entre enzima e substrato; facilidade de reciclagem da enzima utilizada; necessita de poucas etapas para

ampliação de escala e alta eficiência energética (AGUIEIRAS; CALVACANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014).

Este biorreator pode ser operado em modo contínuo ou descontínuo, sendo que no primeiro caso o substrato é convertido em produto em um ciclo único, enquanto que no segundo, a mistura reacional é reciclada através da coluna durante o tempo reacional, convertendo os reagentes em produtos. O modo contínuo é mais interessante que o descontínuo, devido a facilidade de automação e operação, redução de custo com mão de obra, condições de operação mais estáveis e facilidade no controle da qualidade do produto final (CHRISTOPHER; KUMAR; ZAMBARE, 2014; POPPE *et al.*, 2015).

Um dos parâmetros mais importantes neste tipo de biorreator é o tempo de reação (tempo espacial), que é determinado pela vazão do substrato e o volume do biorreator. A vazão deve ser otimizada a fim de propiciar um tempo de contato adequado entre o substrato e a enzima e minimizar as limitações difusionais (POPPE *et al.*, 2015). Além disso, o tamanho da partícula empacotada é de suma importância, devido aos efeitos de limitação de transferência de massa. Este efeito pode ser reduzido utilizando partículas menores, porém partículas muito pequenas (inferiores a 0,05 mm), podem promover queda de pressão no biorreator, que afeta o fluxo do substrato, reduzindo a conversão da reação. Outro fator que pode ocasionar a queda de pressão no leito, é a utilização de substratos com alta viscosidade, podendo ser utilizado um solvente para minimizar este problema (AGUIEIRAS; CALVACANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; POPPE *et al.*, 2015).

3.10.2 Biorreator de leito fluidizado (FBR)

Biorreator de leito fluidizado, do inglês “*Fluidized-bed bioreactor*” (FBR), é um sistema reacional no qual células ou enzimas imobilizadas são mantidas em fluidização por meio do fluxo do substrato, que é bombeado através do leito, sendo realizada por líquido ou gás. Neste sistema, o biocatalisador é mantido em equilíbrio hidrodinâmico obtido pela força de arraste derivada do fluxo ascendente do substrato, do empuxo e da força da gravidade, sendo a velocidade mínima de fluidização definida pela suspensão das partículas quando estas três forças se igualam (AGUIEIRAS; CALVACANTU-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; AMINI *et al.*, 2017; CAPPANNELLA *et al.*, 2016).

Esse biorreator apresenta como vantagem uma elevada transferência de massa, e diferentemente do PBR, a utilização de pequenas partículas de biocatalisador não ocasiona queda de pressão no leito, sendo menos susceptível a formação de caminhos preferenciais

(FENG *et al.*, 2013; POPPE *et al.*, 2015). No entanto, apresenta como desvantagens a utilização de menor quantidade de enzima por volume de reator (comparado ao biorreator de leito fixo), difícil ampliação de escala e baixos rendimentos, em função da elevada vazão (AL-QUODAH *et al.*, 2017; MATTE, *et al.*, 2016; POPPE *et al.*, 2015).

3.10.3 Biorreatores assistidos por campo magnético

Atualmente há diversos estudos sobre reatores/biorreatores assistidos por campo magnético. Este sistema consiste basicamente em aplicar um campo magnético sobre as partículas magnéticas contidas no interior do reator para incrementar seu grau de agitação, visando aprimorar a transferência de massa e a homogeneidade de calor no sistema reacional, aumentando a produtividade e até mesmo o rendimento de algumas reações.

Estes sistemas reacionais estão sendo pesquisados e estudados em diferentes áreas da engenharia, com destaque para os reatores e biorreatores de leito fluidizado (CUBIDES-ROMAN *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2018; SRIAKKARIN *et al.* 2018).

3.10.3.1 Biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR ou MFBR)

Biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente, do inglês “*Magnetically stabilized fluidized-bed bioreactor*” (MSFBR) ou “*Magnetically fluidized-bed bioreactor*” (MFBR), é um sistema reacional similar ao biorreator de leito fluidizado, porém assistido por um campo eletromagnético, de modo que, o suporte utilizado para imobilização da enzima ou a célula deve possuir propriedades magnéticas. Polímeros sintéticos ou naturais com propriedades magnéticas são muito utilizados para esta aplicação (CUBIDES-ROMAN *et al.*, 2017).

Esse sistema reacional possui algumas vantagens em relação ao biorreator de leito fluidizado convencional, sendo uma alternativa para evitar as limitações de transferência de massa e calor, aprimorar o tempo de reação e da mistura, facilitar a separação e o reuso do biocatalisador, reduzir a quebra das partículas do suporte, minimizar a queda de pressão do leito, facilitar o transporte dos sólidos e melhorar a eficiência do contato entre o biocatalisador e o fluido. Além disso, é possível empregar maiores fluxos de fluido e fluxo contracorrente (CUBIDES-ROMAN *et al.*, 2017; ZHOU; CHEN; YAN, 2014; HAJAR; VAHABZADEH, 2016).

A intensidade do campo magnético aplicado e as características das partículas do suporte magnético afetam diretamente as propriedades hidrodinâmicas do leito neste tipo de biorreator (HAJAR; VAHABZADEH, 2016).

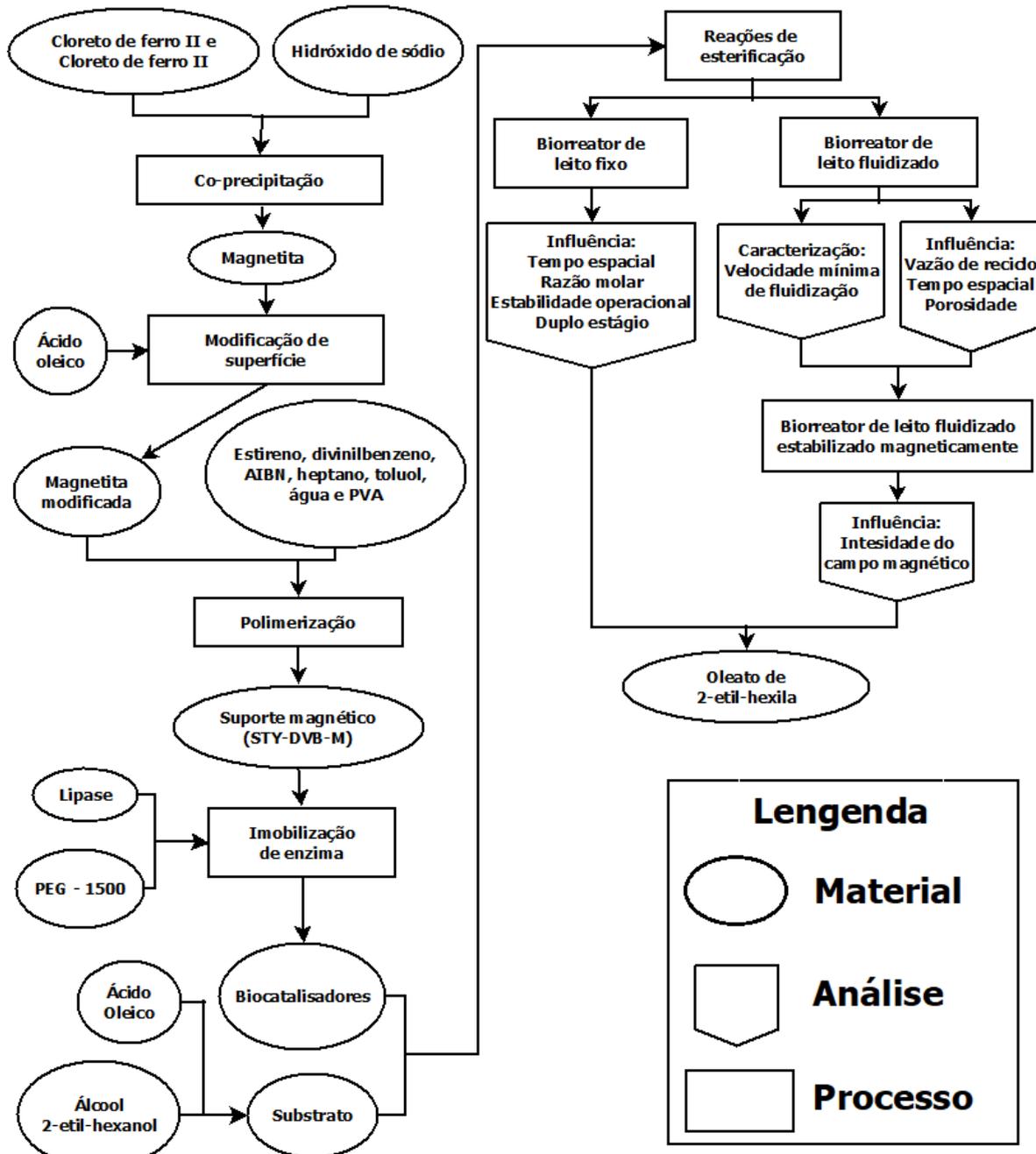
Para um suporte ser utilizado em um MSFBR é necessário que ele possua algumas características e satisfaça alguns critérios em relação à rigidez, porosidade, forma, tamanho, densidade, propriedades magnéticas, carga superficial, hidrofobicidade, concentração de grupos reativos em sua superfície, resistência mecânica, propriedade de agregação e ser inerte quimicamente (CUBIDES-ROMAN *et al.*, 2017).

O poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, suporte empregado neste trabalho, pode ser adequado para esta utilização, pois é possível controlar o tamanho da sua partícula durante a polimerização. Possui mesoporos, elevada área superficial específica, é um material bastante hidrofóbico, possui magnetização de saturação significativa, formato de esfera, sendo inerte quimicamente (BENTO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018b).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O Fluxograma apresentado na Figura 4.1 ilustra as principais etapas que foram seguidas para a execução do presente trabalho.

Figura 4.1 – Fluxograma ilustrativo das principais etapas que foram executadas para o desenvolvimento do trabalho.



Fonte: Próprio autor.

4.1 Materiais

Para a síntese do copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e a recristalização do Azobisisobutironitrila (AIBN) foram utilizados: água ultrapura, álcool polivinílico – PVA 88% hidrolisado – MM 78000 (Polysciences, Inc.), Azobisisobutironitrila - AIBN (MIG Química), divinilbenzeno 80% (Sigma-Aldrich[®]), estireno 99% (Sigma-Aldrich[®]), heptano 95% (Cromoline), metanol 99,8% (Cromoline), e toluol 99,5% (Cromoline).

Para a síntese e modificação da magnetita: acetato de etila 99,5% (Cromoline) água ultra pura, hidróxido de sódio 99% (Synth), cloreto de ferro (II) tetra hidratado 99% (Sigma-Aldrich[®]), cloreto de ferro (III) pentahidratado 97% (Sigma-Aldrich[®]), ácido oleico P.A (Cromoline) e etanol 96% (Cromoline).

Para o processo de imobilização das enzimas utilizou-se a preparação comercial da lipase microbiana de *Candida antarctica* (CALB), adquirida na sua forma livre, da Sigma-Aldrich[®]. Também foram utilizados: polietilenoglicol - PEG MM 1500 (Synth) e heptano 95% (Cromoline).

Para a quantificação da atividade sintética (esterificação) e atividade hidrolítica: acetona (Cromoline), ácido oleico P.S (Cromoline), água destilada, butirato de metila 99,5% (Sigma-Aldrich[®]), diidrogenofosfato de potássio 99% (Cromoline), hidrogenofosfatodissódico 99% (Synth), hidróxido de potássio 85% (Synth), e etanol 96% (Cromoline).

Para a realização da síntese do éster oleato de 2-etil-hexila foram empregados: ácido oleico P.S. 99% (Cromoline), álcool 2-etil-hexanol 99,5% (Cromoline) e peneira molecular 3A, 8-12 mesh (tipo esférica, Sigma-Aldrich[®]).

Para a síntese do padrão cromatográfico do oleato de 2-etil-hexila foram empregados: cloreto de tionila 99,5% (Merck), benzeno 99,8% (Sigma-Aldrich), sódio metálico (Merck), ácido oleico P.S. 99% (Cromoline) e álcool 2-etil-hexanol 99,5% (Cromoline).

4.2 Métodos Experimentais

4.2.1 Síntese do poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M)

4.2.1.1 Síntese da magnetita

A magnetita usada para magnetizar o copolímero foi sintetizada a partir da técnica de co-precipitação utilizando a mistura de 60 mL de cada uma das soluções: cloreto de ferro II ($0,6 \text{ molL}^{-1}$) e cloreto de ferro III ($1,2 \text{ molL}^{-1}$). A solução resultante foi colocada sob agitação mecânica a 65°C , com adição de solução de hidróxido de sódio (4 mol L^{-1}) até pH 11. A massa negra contendo magnetita foi lavada com água ultrapura (UP) e solução 1:1 de acetato de etila e água UP até o pH 7, sendo posteriormente filtrada à vácuo e levada à estufa a 60°C por 18 h (ROSA *et al.*, 2020). A Figura 4.2 mostra a magnetita sintetizada seca.

Figura 4.2 – Magnetita sintetizada seca.

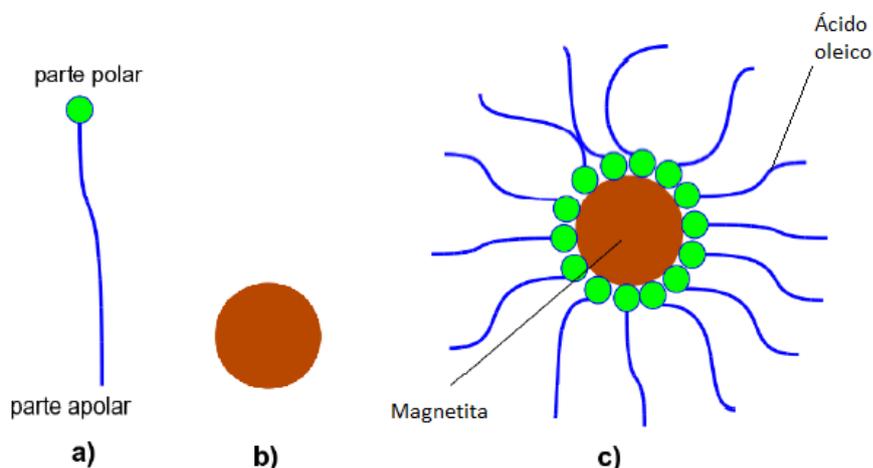


Fonte: próprio autor.

4.2.1.2 Revestimento da magnetita com ácido oleico

Visando aumentar a hidrofobicidade da magnetita, foi realizado uma modificação da sua superfície empregando ácido oleico, conforme metodologia descrita por Bento (2017). Para isso, foram adicionados 3,25g de magnetita, 40 mL de ácido oleico e 80 mL de água UP em um béquer sob agitação mecânica por 15 minutos. A solução resultante foi filtrada a vácuo e lavada com etanol para remover o ácido oleico residual. As partículas magnéticas modificadas foram levadas à estufa a 60°C por 18h para completa secagem. A Figura 4.3 ilustra a modificação da superfície da magnetita.

Figura 4.3 – Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico: a) Ácido oleico, b) Magnetita e c) Partícula de magnetita revestida com ácido oleico.



Fonte: Modificado (LACZKOWSKI, 2010).

4.2.1.3 Purificação do Azobisisobutironitrila (AIBN)

A recristalização do iniciador AIBN foi realizada dissolvendo-se 5,0 gramas em 200 mL de etanol anidro sob agitação magnética vigorosa, até sua completa dissolução. Posteriormente, a solução foi mantida em refrigerador sob temperatura de 4-8°C por 6 horas, e no congelador sob temperatura de -6 a -3 °C por 18 horas. Os cristais foram filtrados e secos em dessecador utilizando sílica gel como agente desumidificante (SILVA *et al.*, 2020b).

4.2.1.4. Polimerização em suspensão

O copolímero de STY-DVB-M foi sintetizado a partir da técnica de polimerização em suspensão, empregando uma fase orgânica e uma fase aquosa, pela metodologia proposta por Rosa *et al.* (2020). A fase orgânica foi composta pelos monômeros de estireno e divinilbenzeno na proporção de 1:1 em peso (fase dispersa) e a fase aquosa composta por uma solução aquosa do agente de suspensão, álcool polivinílico (PVA), na concentração de 1% (m/v) (fase contínua). À essa mistura também foram adicionados toluol como solvente de alta afinidade, heptano como solvente de baixa afinidade, AIBN como iniciador e magnetita modificada na proporção de 10% (m/m) em relação aos monômeros. A razão entre a fase orgânica e aquosa utilizada foi de 1:8 (v/v). A Tabela 4.1 apresenta as quantidades utilizadas de cada reagente na polimerização.

Tabela 4.1- Formulação utilizada nas reações de polimerização.

Reagente	Massa (g)
AIBN	0,125
Água ultrapura	400
Divinilbenzeno	6,283
Estireno	6,283
Heptano	18,823
Magnetita	1,257
modificada	
PVA	4,000
Toluol	18,823

Fonte: próprio autor.

A polimerização foi realizada em um reator de vidro encamisado (P.H.D. equipamentos para laboratório), com capacidade total de 0,5 L, sob agitação mecânica de 310 rpm e atmosfera inerte de nitrogênio, a 70 °C por 6 horas. A Figura 4.4 mostra o aparato experimental utilizado para sintetizar o polímero. Após a polimerização, o meio contendo as partículas do copolímero foi filtrado a vácuo e lavado exaustivamente com água UP, acetona e etanol, para a remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C por 18 h e peneirado para seleção de partículas de tamanho entre 0,177 a 0,707 mm. A Figura 4.5 mostra o suporte de STY-DVB-M seco.

Figura 4.4 – Aparato experimental utilizando para sintetizar o suporte de STY-DVB-M: 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; 6 – Entrada para o gás nitrogênio.



Fonte: Próprio Autor

Figura 4.5 – Suporte de STY-DVB-M seco.



Fonte: Próprio Autor

4.2.3 Imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) no suporte polimérico

Para a imobilização da lipase CALB no suporte polimérico foi utilizada a metodologia proposta por Silva *et al.* (2023). O suporte sintetizado (STY-DVB-M) foi embebido em heptano em uma proporção de 1:10 (m/v) e mantido sob agitação por 2 h em ‘*shaker*’. Em seguida foram adicionados 100 μL de solução aquosa 5 g L^{-1} de polietilenoglicol (PEG-1500) e 250 μL de lipase, para cada grama de suporte. A suspensão resultante foi colocada sob suave agitação até adesão da enzima ao suporte, seguido de contato estático por um período de 18 h a 4°C (Figura 4.6). Posteriormente, o derivado imobilizado foi filtrado a vácuo e lavado com heptano até a redução da umidade para valores inferiores a 10%.

Figura 4.6 – Derivado imobilizado embebido em heptano.



Fonte: próprio autor.

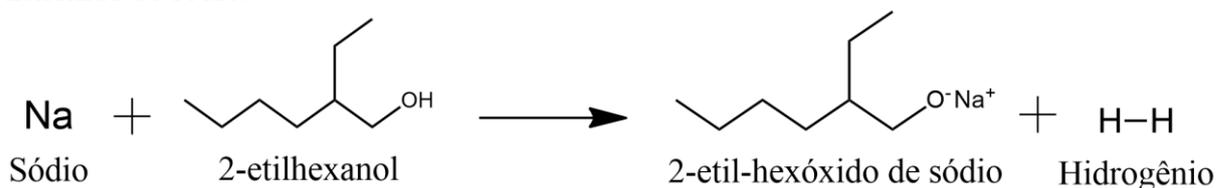
4.2.4 Síntese do padrão cromatográfico do oleato de 2-etil-hexila

O padrão cromatográfico do oleato de 2-etil-hexila foi sintetizado a partir da reação do 2-etil-hexóxido de sódio e cloreto de octadec-9-enoíla, de acordo com metodologia modificada de Urioste *et. al* (2008). Para a síntese do isoctóxido de sódio foram adicionados 40 g de 2-etil-hexanol (em excesso) e 0,8 g de sódio metálico em um béquer de 100 mL, sendo em seguida agitado mecanicamente por 1 hora para que todo o sódio reagisse com o 2-etil-hexanol (Figura 4.7).

A síntese do cloreto de octadec-9-enoíla foi conduzida em um balão de fundo redondo de 100 mL, ao qual foram adicionados 10 g de ácido oleico, sendo em seguida aquecido até temperatura de 50 °C, e então adicionados vagorosamente 8,4 g de cloreto de tionila (SOCl_2),

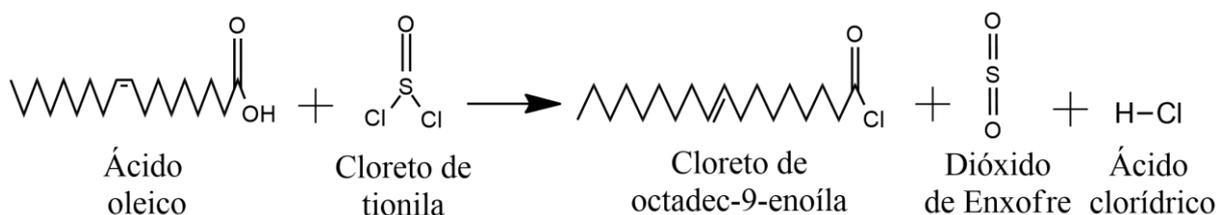
por meio de um amostrador automático. A reação foi realizada durante 3 horas (Figura 4.8) e o SOCl_2 residual foi removido por evaporação à vácuo, com adição de 10 mL de benzeno.

Figura 4.7 – Ilustração da reação entre sódio e 2-etil-hexanol para a síntese do 2-etil-hexóxido de sódio.



Fonte: Próprio autor.

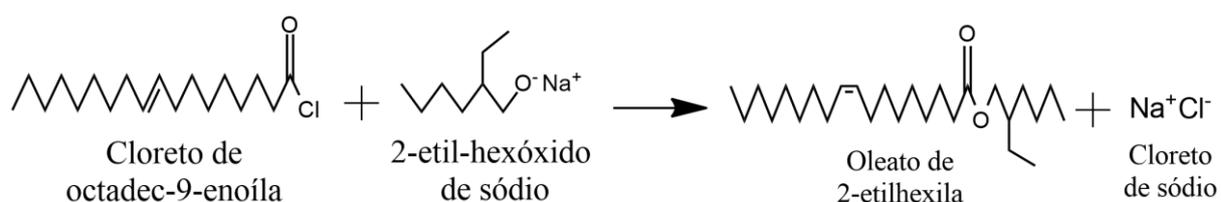
Figura 4.8 – Ilustração da reação entre ácido oleico e cloreto de tionila.



Fonte: Próprio autor.

Para a síntese do oleato de 2-etil-hexila, o 2-etil-hexóxido de sódio e o cloreto de octadec-9-enoíla foram colocados em um balão de três bocas de 100 mL, sob agitação mecânica de 300 rpm durante 2 horas. O meio reacional foi então filtrado para separação do cloreto de sódio formado. A Figuras 4.9 ilustra a reação da síntese do éster.

Figura 4.9 – Ilustração da reação entre 2-etil-hexóxido de sódio e cloreto de octadec-9-enoíla para a síntese do oleato de 2-etil-hexila.

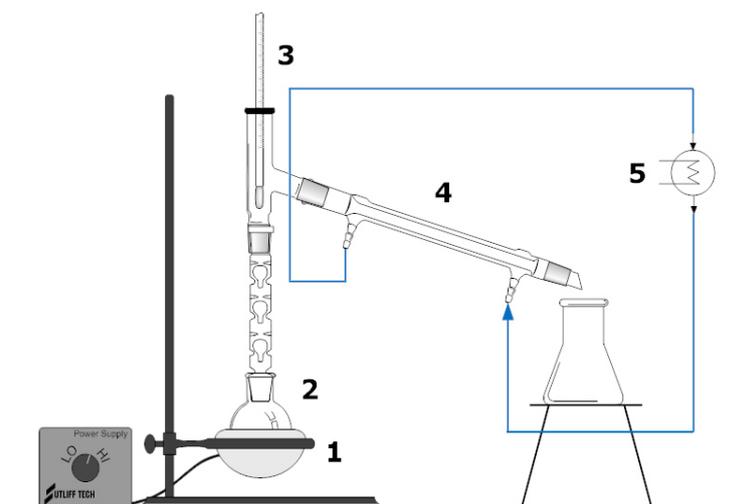


Fonte: Próprio autor.

O produto foi destilado à vácuo (0,4 mmHg), sendo primeiramente retirada a fração que continha o 2-etil-hexanol e posteriormente a fração contendo o oleato de 2-etil-hexila puro, sendo esta destilada a temperatura de 225 °C. A Figura 4.10 ilustra o esquema do

aparato experimental utilizado para a destilação e purificação do padrão de oleato de 2-etil-hexila.

Figura 4.10 – Esquema experimental utilizado para a destilação e purificação do padrão de oleato de 2-etil-hexila: 1 – Manta de aquecimento; 2 – Balão de fundo redondo; 3 – Termômetro; 4 – Condensador; 5 – Banho termostático.



Fonte: próprio autor.

4.2.5 Síntese do oleato de 2-etil-hexila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M

As sínteses do éster oleato de 2-etil-hexila foram realizadas via esterificação enzimática, em modo de operação contínuo, empregando como matéria-prima ácido oleico e álcool 2-etil-hexanol e lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em STY-DVB-M, como biocatalisador. O prosseguimento da reação foi acompanhado por meio da retirada de alíquotas a fim de quantificar a concentração residual do ácido oleico, e a formação do oleato de 2-etil-hexila, sendo calculados os rendimentos das reações, as concentrações e as produtividades do éster.

Os substratos foram preparados em frascos de vidro com capacidade de 1L, sendo adicionadas massas adequadas de ácido oleico e 2-etil-hexanol para cada razão molar testada. Peneira molecular (tipo esférica, Sigma-Aldrich®) foi utilizada para retirar a água presente no substrato preparado, numa relação de 10% (m/v). Primeiramente a peneira molecular foi levada a um forno mufla (SP-1200, SP Labor®) a 300°C por 3 horas a fim de desidratá-la. Após o tempo determinado, a peneira foi colocada em um dessecador para resfriamento, e

então transferida a um frasco de vidro de 100 mL juntamente com o substrato preparado. O substrato foi armazenado em refrigerador na temperatura de 4-8°C por 18 horas.

4.2.5.1 Síntese do oleato de 2-etil-hexila realizada em biorreator de leito fixo (PBR)

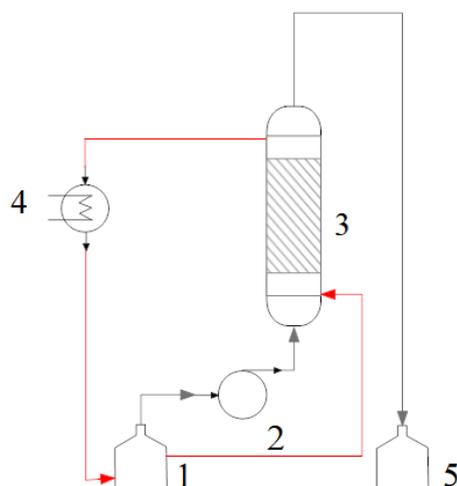
As sínteses conduzidas em reator de leito fixo foram realizadas em coluna de vidro encamisada com capacidade total de 15,8 mL (11 mm de diâmetro interno e 166 mm de altura), contendo 4,3g de biocatalisador. Essa relação entre a altura/diâmetro da coluna foi baseada em resultados anteriores que mostraram que colunas que apresentam uma maior relação altura/diâmetro (l/d) sofrem menor limitação de transferência de massa (DAMSTRUP *et al.*, 2007).

Para a alimentação do biorreator foi efetuado um bombeamento do substrato através do leito, com auxílio de uma bomba peristáltica (120S/D1, Watson-Marlow) e mangueiras de marprene (Watson-Marlow) apresentando as seguintes especificações: 1,6 x 1,6 mm (902.0016.016); 4,8 x 1,6 mm (902.0048.016); 8,0 x 1,6 mm (902.0080.016) e 9,6 x 2,4 mm (902.0096.024). Além disso, o sistema experimental foi composto por um reservatório de vidro cilíndrico encamisado (100 mL) com três bocas, banho termostaticado (Tecnal[®], TE-2005) e agitador magnético (Heidolph, MR2002).

A Figura 4.11 ilustra o esquema experimental que foi utilizado para a condução da síntese do éster oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fixo em modo contínuo de operação.

Nessa configuração de biorreator foram avaliadas diferentes vazões volumétricas de alimentação do substrato (tempo espacial) e diferentes razões molares (ácido:álcool) entre os reagentes de partida (ácido oleico e 2-etil-hexanol), a fim de estudar a influência dessas variáveis no desempenho da síntese do éster emoliente.

Figura 4.11 – Aparato experimental do biorreator de leito fixo para a síntese do éster oleato de 2-etil-hexila operado em modo contínuo. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 – Bomba peristáltica; 3 – Coluna de vidro; 4 – Banho termostaticado; 5 – Reservatório de produto.



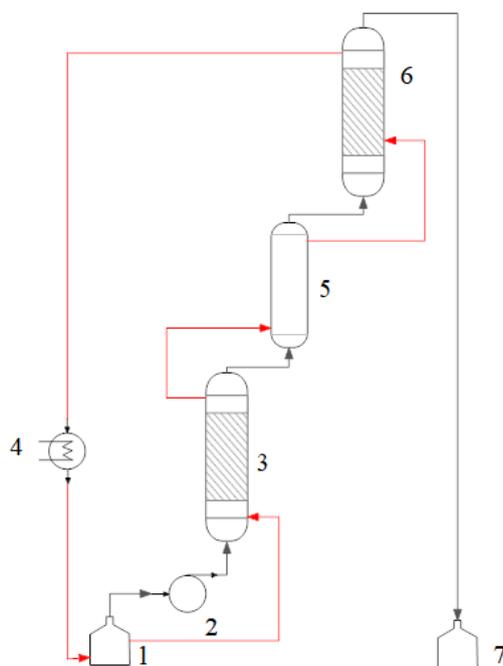
Fonte: Próprio autor.

4.2.5.1.2 Estratégias para remoção da água formada nas reações de esterificação

Como a água é um subproduto da reação de esterificação, foram propostas estratégias a fim de removê-la do meio reacional, pois pelo o princípio de L^ê Chatelier, sabe-se que a remoção de um dos produtos promove o deslocamento do equilíbrio da reação no sentido de formação de produtos.

Para o biorreator de leito fixo, foi utilizada a configuração de duplo estágio, empregando coluna extratora de água entre os biorreatores em série, com capacidade total de 9,7 mL (15 mm de diâmetro interno e 55 mm de altura) contendo 10,75 g de peneira molecular ativada (relação de 1,25:1 entre massa de peneira molecular e massa de biocatalisador). O aparato experimental pode ser visualizado na Figura 4.12.

Figura 4.12 - Aparato experimental para biorreator de leito fixo de duplo estágio com coluna extratora de umidade. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 – Bomba peristáltica; 3 – Primeiro estágio de coluna de vidro; 4 – Banho termostaticado; 5 – Coluna extratora de água; 6 – Segundo estágio de coluna de vidro; 7 – Reservatório de produto.



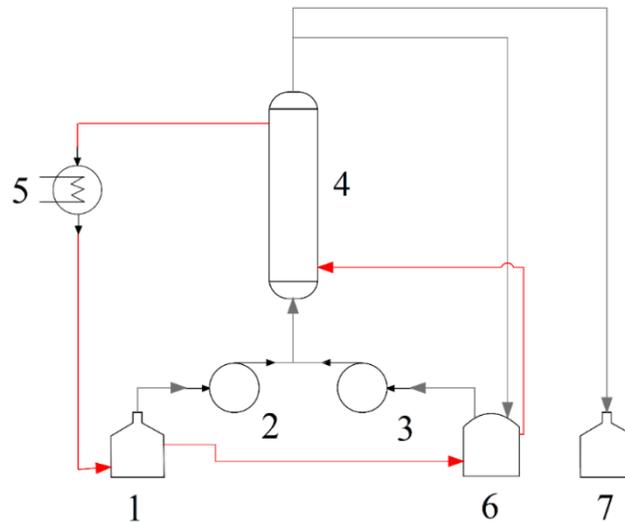
Fonte: Próprio autor.

4.2.5.2 Síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fluidizado (FBR)

Neste biorreator foram empregadas as melhores condições de razão molar (ácido:álcool) estabelecida para o reator de leito fixo. As sínteses foram realizadas em coluna de vidro encamisada com capacidade total de 35,7 mL (15 mm de diâmetro interno e 202 mm de altura).

Foi analisada a influência da porosidade do leito sobre o rendimento da reação, concentração e produtividade em éster, em diferentes tempos espaciais. A Figura 4.13 ilustra o aparato experimental que foi utilizado neste tipo de biorreator.

Figura 4.13 – Aparato experimental do biorreator de leito fluidizado. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 e 3 – Bombas peristálticas; 4 – Coluna de vidro; 5 – Banho termostaticado; 6 - Reservatório de substrato do reciclo; 7 - Reservatório de produto.



Fonte: próprio autor.

4.2.5.2.1 Testes de expansão do leito fluidizado

Visando determinar a velocidade mínima de fluidização para o reator de leito fluidizado, foram realizados ensaios de expansão do leito em função da vazão ascendente do fluido. Os testes foram conduzidos empregando-se substrato com razão molar de 1:1 (ácido: álcool) e temperatura de 50 °C, sendo variada a quantidade do biocatalisador CALB-STY-DVB-M (1,0 a 2,5 g). O derivado imobilizado foi previamente inativado em estufa a 110 °C por 2 horas, sendo medida a altura do leito em função da vazão utilizada, que foi gradativamente aumentada.

Para cada condição testada foi calculado o tempo espacial (τ) e a vazão (Q) de acordo com as Equações 4.1 e 4.2.

$$\tau = \frac{V_{\text{útil}}}{Q} \quad (4.1)$$

$$V_{\text{útil}} = \pi \cdot r^2 \cdot h \cdot \frac{m}{\rho} \quad (4.2)$$

Em que: $V_{\text{útil}}$ = volume útil do biorreator (cm^3); r = raio do biorreator (cm); h = altura do leito (cm); m = massa de biocatalisador (g); ρ = massa específica do biocatalisador utilizado ($\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$).

A porosidade do leito (ε) foi calculada pela Equação 4.3.

$$\varepsilon = \frac{(V_t - V_s)}{V_t} = 1 - \frac{m}{\rho_s \cdot A \cdot h} \quad (4.3)$$

Em que: ε = porosidade do leito; h = altura do leito de partículas (cm); A = área da secção transversal do biorreator (cm^2); V_t = volume do biorreator (cm^3); V_s = volume ocupado pelas partículas (cm^3); ρ_s = densidade do sólido (g cm^{-3}); m = massa do biocatalisador (g).

Utilizando as Equações 4.4, 4.5 e 4.6, propostas por Richardson e Zaki (1954), que são empregadas para expansão de leitos com partículas esféricas uniformes de diâmetro uniforme, foi calculada a velocidade mínima de fluidização.

$$u = \frac{Q}{A} \quad (4.4)$$

$$\frac{u}{u_{tc}} = \varepsilon^n \quad (4.5)$$

$$\log u_{tc} = \log u_t - \frac{d_p}{d_i} \quad (4.6)$$

Em que: u = velocidade superficial do fluido (cm min^{-1}); u_{tc} = velocidade terminal da partícula corrigida pelo efeito da parede da coluna (cm min^{-1}); η = coeficiente de expansão; u_t = velocidade terminal da partícula (cm min^{-1}); d_i = diâmetro interno do reator (cm); d_p = diâmetro da partícula sólida (cm).

Linearizando a Equação 4.5 por meio da aplicação de logaritmo neperiano, obtém-se a relação expressão pela Equação 4.7:

$$\ln u = n \cdot \ln \varepsilon + \ln u_{tc} \quad (4.7)$$

Desta forma, foi elaborado gráficos de $\ln(u)$ versus $\ln(\epsilon)$, e os coeficientes angular e linear da reta obtida correspondem, respectivamente, ao coeficiente de expansão, η , e ao logaritmo neperiano da velocidade terminal da partícula corrigida, u_{tc} .

Para calcular a altura mínima da coluna do biorreator de leito fluidizado foi utilizada a Equação 4.8 que foi calculada a partir da combinação das Equações 4.1, 4.2 e 4.3.

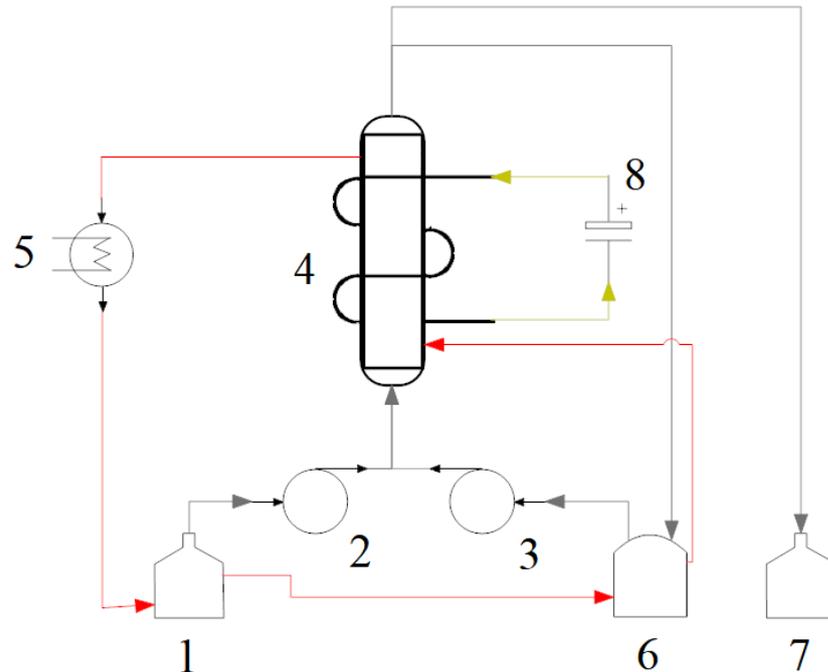
$$h_{mín} = \frac{4 \cdot \tau \cdot Q_{mín}}{\pi \cdot D^2 \cdot \epsilon_{mín}} \quad (4.8)$$

4.2.5.3 Síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR)

As reações de esterificação do ácido oleico com 2-etil-hexanol para a síntese do oleato de 2-etil-hexila foram conduzidas de maneira contínua em biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente a 50 °C empregando razão molar de 1:1 (ácido:álcool). O sistema experimental foi composto por uma coluna de vidro encamisada com capacidade total de 35,7 mL (15 mm de diâmetro interno e 202 mm de altura), sendo empregada recirculação do substrato (vazão = 0,70mL min⁻¹) com saída contínua do efluente. A coluna de vidro do biorreator foi inserida dentro de um solenoide de cobre AWG 8 (200 mm de altura e 140 mm de diâmetro), constituído por fio de cobre envolto em um suporte plástico, sendo a intensidade do campo magnético controlada por uma fonte de alimentação de corrente contínua (FA-2030, Instrutherm), que foi acoplada aosolenoide por meio de um cabo de transmissão de 3,5 metros, AWG 3.

Nesta configuração o biorreator foi estabilizado magneticamente, sendo analisada a influência da intensidade do campo magnético na síntese do éster emoliente, com o auxílio de um Gaussímetro (TLMP-HALL-01k, GlobalMag®) com sonda hall axial de 200 mm. A Figura 4.14 ilustra o aparato experimental utilizado.

Figura 4.14 – Aparato experimental do biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 e 3 – Bombas peristálticas; 4 – Coluna de vidro envolta de solenoide; 5 – Banho termostaticado; 6 - Reservatório de substrato do reciclo; 7 - Reservatório de produto; 8 – Fonte variável de energia.



Fonte: Próprio autor.

4.3 Métodos de análises

4.3.1 Atividade sintética

Foi avaliada a atividade sintética (esterificação) do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, conforme metodologia modificada de Pinto *et al.* (2014). Foram transferidos a um frasco de vidro com capacidade de 100 mL, 11,1 mL de ácido oleico, 1,9 mL de etanol anidro e 0,5 de biocatalisador. O frasco foi acondicionado em *shaker* durante 1 hora a temperatura de 50 °C e agitação de 200 rpm, sendo retiradas amostras de 0,1 mL em tempos pré-determinados. Uma unidade de atividade enzimática de esterificação (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μmol de oleato de etila por minuto de reação sob as condições do ensaio. A atividade sintética foi determinada apenas na região linear do gráfico: concentração do produto *versus* unidade de tempo.

4.3.2 Atividade hidrolítica

Para quantificar a atividade hidrolítica dos biocatalisadores, foi utilizado o método da hidrólise do butirato de metila, conforme metodologia descrita por Fidalgo *et al.* (2016). Em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 30 mL de tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ pH 7 e 300 µL de butirato de metila. A mistura foi acondicionada em *shaker* a 45 °C e 200 rpm. Ao erlenmeyer foram adicionados 0,05 g de biocatalisador, sendo a reação finalizada em 10 minutos. Posteriormente 10 mL de solução etanol-acetona 1:1 (v/v) foram adicionadas à mistura, na qual foi titulada com KOH 0,05 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade hidrolítica foi calculada de acordo com a Equação 4.9.

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot C \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (4.9)$$

Em que: A = atividade hidrolítica (U.g⁻¹), V_a = volume de solução de KOH utilizado na titulação da amostra (mL); V_b = volume de solução de KOH utilizado na titulação do branco (mL); C = concentração em quantidade de matéria da solução de KOH (mol L⁻¹); t = tempo de reação (min); e m = massa de biocatalisador utilizado (g).

Uma unidade de atividade hidrolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de ácido butírico por minuto de reação sob as condições do ensaio.

4.3.3 Rendimento de imobilização

O rendimento de imobilização (η%) foi mensurado pelo método proposto por Alloue *et al.* (2008), conforme equação 4.10.

$$\text{Rendimento de imobilização (\%)} = \frac{A_{im}}{A_{li}} \times 100 \quad (4.10)$$

Sendo que: A_{im} é a atividade hidrolítica recuperada pelo derivado imobilizado (U g⁻¹) e A_{li} é a atividade hidrolítica da enzima livre oferecida para imobilização (U g⁻¹).

4.3.4 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade do AIBN e dos biocatalisadores foi realizada em balança analítica acoplada com infravermelho (MOC63u, Shimadzu) durante 3 min a 105 °C. A umidade dos substratos utilizados nas esterificações e dos efluentes dos biorreatores foram determinados em Titulador Karl Fisher (AKF5000, Koehler).

4.3.5 Acompanhamento das reações de esterificação

Em tempos pré-determinados foram coletas amostras das reações de esterificação para consumo do ácido graxo e quantificação do éster formado.

A quantificação do teor do éster oleato de 2-etil-hexila formado foi realizada por cromatografia em fase gasosa (CG) e o consumo do ácido graxo foi acompanhado pela titulação com solução aquosa de KOH (0,04 molL⁻¹) empregando fenolftaleína como indicador, sendo adicionados 10 mL de etanol à cada alíquota de 0,1 g do meio reacional.

4.3.5.1 Rendimento de esterificação

O cálculo do rendimento da reação foi baseado na proporção estequiométrica do éster sintetizado empregando-se a Equação 4.11.

$$\text{Rendimento de esterificação (\%)} = \left(\frac{C_{\text{éster}}}{C_i} \right) \cdot 100 \quad (4.11)$$

Em que: C_i = Concentração inicial do reagente limitante (ácido oleico ou 2-etil-hexanol) no substrato (mol L⁻¹) e $C_{\text{éster}}$ = Concentração do éster em um determinado tempo de reação de esterificação (mol L⁻¹).

4.3.5.2 Concentração em éster

A concentração do éster oleato de 2-etil-hexila nas amostras analisadas foi obtida por análise em cromatografia gasosa a partir do método desenvolvido no presente trabalho.

4.3.5.3 Produtividade

O cálculo da produtividade em éster obtida nos processos enzimáticos foi realizado empregando-se a Equação 4.12.

$$\text{Produtividade (mmol g}^{-1}\text{h}^{-1}) = \frac{C_{\text{éster}} \cdot Q \cdot 60}{m} \quad (4.12)$$

Em que: $C_{\text{éster}}$ = é a concentração em éster formada na reação de esterificação em mol L^{-1} , Q = é a vazão do efluente do biorreator em mL min^{-1} , e m = é a massa de biocatalisador contido na coluna do biorreator em gramas.

4.3.5.3 Estabilidade operacional do biocatalisador

A estabilidade operacional do biocatalisador foi avaliada conforme metodologia proposta por Pires-Cabral *et al.* (2010). As Equações 4.13 e 4.14 mostram como foram calculados o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) e a constante de desativação (K_d).

$$A_t = A \cdot e^{-K_d \cdot t} \quad (4.13)$$

$$t_{1/2} = \frac{\text{Ln } 2}{K_d} \quad (4.14)$$

Em que: (A) é a atividade de referência, calculada a partir do rendimento de esterificação inicial, que representa 100% da atividade, (A_t) é a atividade residual em cada tempo analisado, estimada pela razão entre o rendimento de esterificação em um determinado tempo (t) e o rendimento de esterificação de referência. O ajuste do modelo da Equação 4.13 foi calculado pelo software Origin 9.0.

4.3.6 Teste de Tukey

Visando verificar a influência da variação da intensidade do campo magnético aplicado ao biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente em relação ao biorreator de leito fluidizado, foi utilizado o teste de Tukey, uma ferramenta estatística, para comparações múltiplas, nas quais foram analisadas no software Statistica 12.5.

5 RESULTADOS

5.1 Características do suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado e do biocatalisador desenvolvido

O biocatalisador utilizado no presente trabalho foi obtido a partir da imobilização da lipase de *Candida antarctica* B em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (CALB-STY-DVB-M).

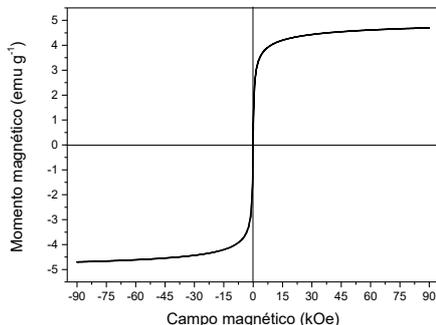
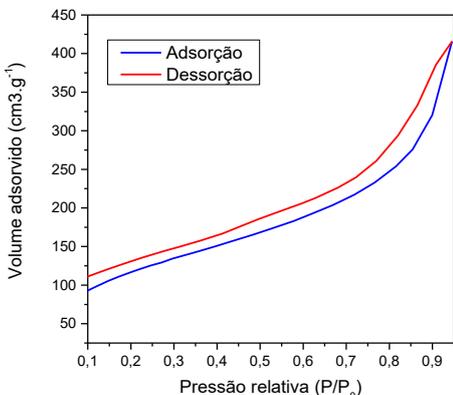
Inicialmente foram analisadas algumas características do suporte polimérico sintetizado (STY-DVB-M), como sua magnetização, área superficial específica, diâmetro médio e volume de poros, sendo estes dados obtidos por Rosa (2019) em sua dissertação de Mestrado. Posteriormente, visando verificar a eficiência da imobilização da lipase nessa matriz polimérica magnetizada e mensurar o poder de catálise do biocatalisador obtido, foi calculado o rendimento de imobilização e quantificada a atividade enzimática sintética e hidrolítica do sistema imobilizado.

A Tabela 5.1 apresenta as características do suporte utilizado e do biocatalisador obtido. A partir da curva de histerese obtida pela análise da magnetização do suporte polimérico realizada no magnetômetro de amostra vibrante (VSM), foi possível constatar que o STY-DVB-M demonstrou magnetização de saturação de aproximadamente $4,5 \text{ emu g}^{-1}$, atingindo a saturação em aproximadamente 30 kOe. O material apresentou coercitividade e remanência quase nulas, com característica de materiais superparamagnéticos, comuns as ferritas (ZHAO, ZHANG, FENG, 2012).

De acordo com os dados obtidos pela análise de BET, o material pode ser classificado como mesoporoso, visto que possui poros com diâmetro médio entre 2 e 50 nm. Além disso, o valor da área superficial específica do copolímero magnetizado ($437 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$) sugere sua adequação para a imobilização de algumas enzimas, já que apresenta área superficial específica bastante elevada (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

Resultados similares as análises de BET encontrados por Rosa (2019) foram obtidos por Deluzel *et al.* (2000), que sintetizaram o poli(estireno-co-divinilbenzeno) pela técnica de polimerização em suspensão, e analisaram as partículas por BET, obtendo área superficial de $599 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, diâmetro médio de poro de aproximadamente 4 nm e volume de poros de $0,44 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$.

Tabela 5.1 – Características do suporte STY-DVB-M e do biocatalisador CALB-STY-DVB-M.

Análise	Dados complementares	Resultado
<p>Curva de magnetização</p> <p>-</p> <p>Laço de histerese *</p>		<p>Magnetização de saturação de aproximadamente 4,5 emu g⁻¹</p>
<p>Análise Textural pelo Método de BET</p> <p>-</p> <p>Isoterma de Adsorção e Dessorção *</p>		<p>Área superficial específica de 437(m²g⁻¹)</p> <p>Diâmetro médio de poro de 5,9(nm)</p> <p>Volume de poros de 0,64(cm³g⁻¹)</p>
<p>Rendimento de imobilização do CALB-STY-DVB-M **</p>	-	92,62 ± 5,24 (%)
<p>Atividade sintética do CALB-STY-DVB-M **</p>	Esterificação do oleato de etila	179,64 ± 15,51 (U g ⁻¹)
<p>Atividade hidrolítica do CALB-STY-DVB-M **</p>	Hidrólise do butirato de metila	522,97± 19,14 (U g ⁻¹)

Fonte: *Rosa (2019), ** Próprio autor.

Em relação as atividades enzimáticas obtidas pelo CALB-STY-DVB-M, é possível notar que o biocatalisador apresentou atividade sintética e atividade hidrolítica consideráveis, corroborando com o valor da área superficial obtida para o suporte utilizado. Além disso, o

elevado rendimento de imobilização mostra que o processo de imobilização foi bem sucedido e a matriz de imobilização é bastante adequada para esta aplicação.

Em estudo realizado por Monteiro *et al.* (2019) em que avaliaram o rendimento de imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) em suporte de nanopartículas magnéticas, pela técnica de adsorção física, encontraram rendimento de imobilização de 57,6%, inferior ao obtido no presente trabalho.

Rodrigues *et al.* (2008a) sintetizaram um derivado imobilizado de lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em carbono ativado por adsorção física, e obtiveram 141,81 U g⁻¹ de atividade hidrolítica a partir da hidrólise do butirato de metila. Em outro trabalho desenvolvido por Rodrigues *et al.* (2008b) na qual produziram um biocatalisador a partir da imobilização por ligação covalente da lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em agarose-glioxil ativada com glicidol, obtiveram 845 U g⁻¹ de atividade hidrolítica a partir do mesmo método de quantificação. Esses resultados demonstram que a atividade hidrolítica obtida pelo CALB-STY-DVB-M no presente trabalho é adequada, visto que está dentro da faixa de valores obtidos por outros autores.

Resultados similares a atividade sintética obtida pelo CALB-STY-DVB-M, foi constatada por Foresti & Ferreira (2007), que desenvolveram um derivado imobilizado a partir da imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) em quitosana por meio de ligação covalente, e obtiveram 335,66U g⁻¹ de atividade a partir da esterificação do oleato de etila, comprovando o bom desempenho do biocatalisador sintetizado no presente trabalho.

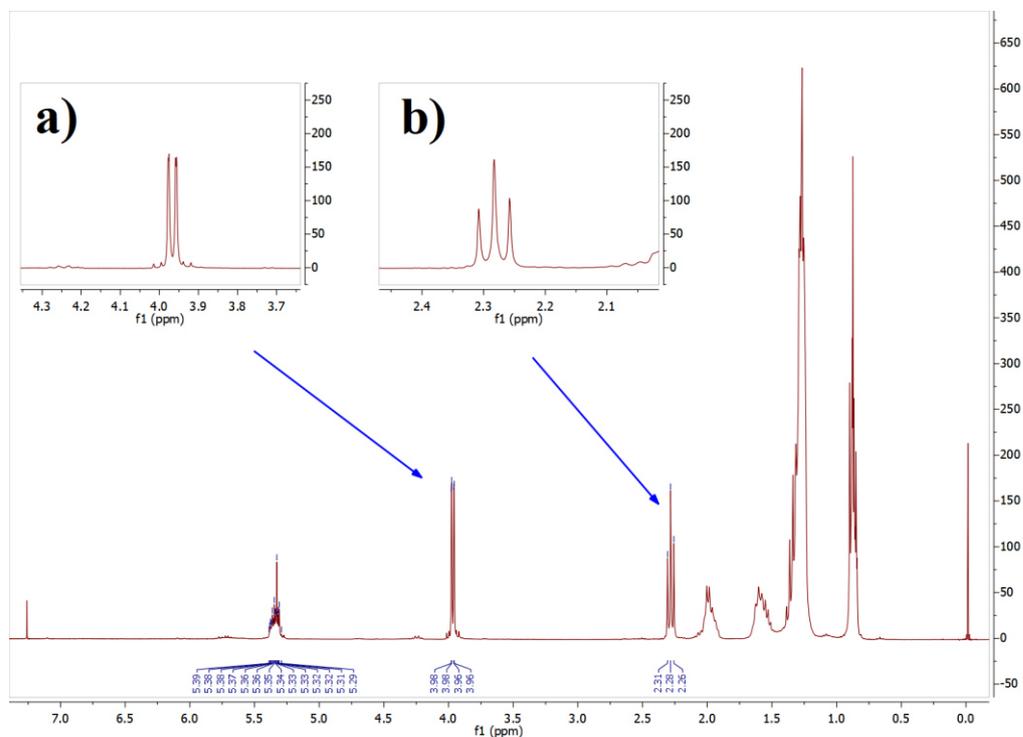
5.2 Estabelecimento do método de análise para determinação do teor do oleato de 2-etil-hexila

5.2.1 Caracterização do oleato de 2-etil-hexila por RMN ¹H e RMN ¹³C

O padrão cromatográfico de oleato de 2-etil-hexila sintetizado de acordo com item 4.2.4, teve sua estrutura química confirmada pela análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H) e de carbono (RMN ¹³C).

As Figuras 5.1 e 5.2 mostram os espectros obtidos pela análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ¹H) e pela análise de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ¹³C), respectivamente.

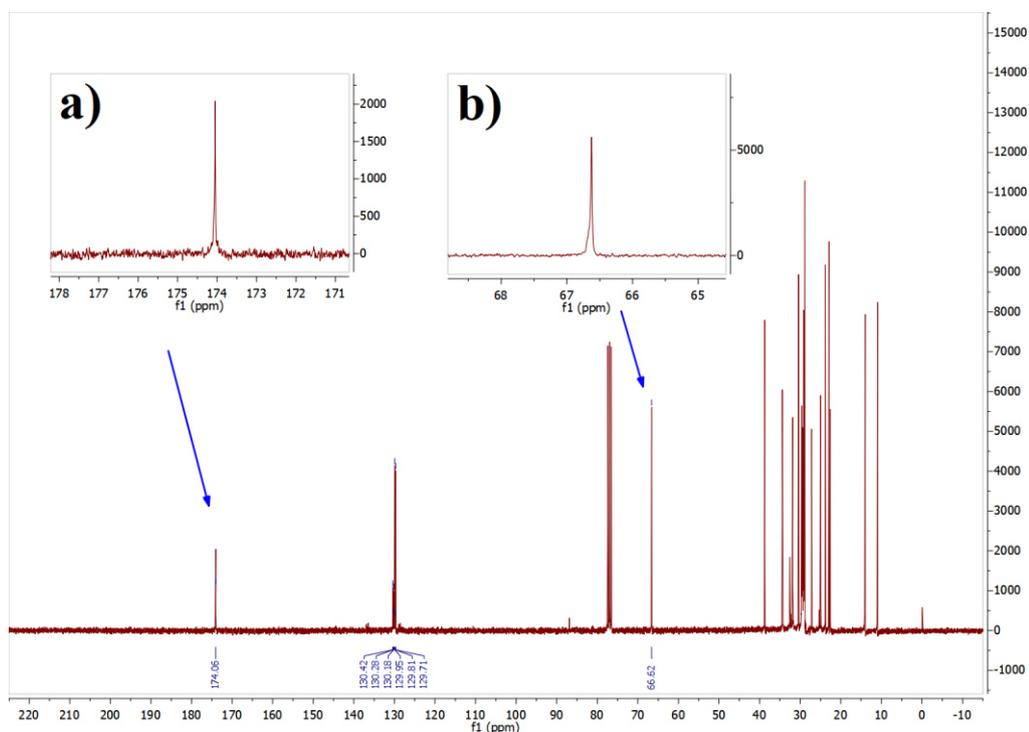
Figura 5.1 - Espectro obtido para o oleato de 2-etil-hexila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H): a) Sinais de deslocamento dos hidrogênios do carbono ligados ao oxigênio da carbonila referente ao álcool; b) Sinais de deslocamento dos hidrogênios do carbono (denominado carbono α) ligados ao grupo carbonila referente ao ácido.



Fonte: Próprio autor

De acordo com Pavia *et al.* (2015), existem dois tipos de hidrogênios distintos característicos nos ésteres: a) os hidrogênios do carbono ligados ao oxigênio da carbonila referente ao álcool (que origina o éster), apresentando sinais de deslocamento entre 3,5-4,8 (ppm) e b) os hidrogênios do carbono (denominado carbono α) ligados ao grupo carbonila referente ao ácido (que origina éster), apresentando sinais de deslocamento entre 2,1-2,5 (ppm). Além disso, os hidrogênios dos dois carbonos ligados pela insaturação apresentam sinais de deslocamento em 4,5-6,5 (ppm). Essas evidências são observadas no espectro da Figura 5.1, confirmando a estrutura química do oleato de 2-etil-hexila.

Figura 5.2 – Espectro obtido para o oleato de 2-etil-hexila a partir da análise de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN ^{13}C): a) Sinais de deslocamento do carbono da carbonila; b) Sinais de deslocamento do carbono ligado a carbonila referente ao álcool.



Fonte: Próprio autor.

No espectro da Figura 5.2, em (a) é possível identificar o carbono referente a carbonila na região de δ 174,02-173,11 (ppm) e em (b) o carbono ligado à carbonila referente ao álcool, apresentando sinal de deslocamento em δ 66,58-66,71 (ppm). Os carbonos ligados entre si por insaturação, apresentam sinais de deslocamento de δ 129,68-130,45 (ppm), confirmando também a formação do éster (LAGE *et al.*, 2016; PAVIA *et al.*, 2015).

As Tabelas 5.2 e 5.3 mostram os principais grupos químicos e seus respectivos sinais de deslocamentos com referência ao tetrametilsilano, para análise de RMN ^1H e RMN ^{13}C , respectivamente.

Tabela 5.2 – Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ^1H .

Grupo químico	Sinais de deslocamento δ (ppm)
R-CH ₃	0,7-1,3
R-CH ₂ -R	1,2-1,4
R ₃ -CH	1,4-1,7
C=C-C-H	1,6-2,6
-C=C-H	4,5-6,5

Fonte: (PAVIA *et al.*, 2015).

Tabela 5.3 – Sinais de deslocamento para cada tipo de grupo químico para análise de RMN ^{13}C .

Grupo químico	Sinais de deslocamento δ (ppm)
R-CH ₃	8-30
R-CH ₂ -R	15-55
R ₃ -CH ou R ₄ C	20-60
-C=C- (carbono insaturado sp ²)	100-150
C=O (carbonila)	155-185

Fonte: (PAVIA *et al.*, 2015).

5.2.2. Desenvolvimento do método cromatográfico para quantificação do oleato de 2-etil-hexila

O método de análise para quantificação do teor do éster oleato de 2-etil-hexila foi realizado 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). Os fluxos dos gases para alimentação do detector foram mantidos em 40 e 400 mLmin⁻¹ de H₂ e ar sintético, respectivamente, sendo N₂ utilizado como gás de arraste (variação de fluxo entre 0,2 a 1 mLmin⁻¹).

O estabelecimento do método de análise foi iniciado com uma isoterma a 105 °C por 7 minutos e vazão de N₂ de 0,2 mLmin⁻¹. Posteriormente a vazão do gás de arraste foi alterada para 1 mLmin⁻¹, e três rampas de aquecimento foram estabelecidas: 20 °C min⁻¹ até atingir 130 °C, mantendo-se constante por 1 min; 25 °C min⁻¹ até atingir 200 °C, mantendo-se constante por 2 minutos e 25 °C min⁻¹ até atingir 280 °C, mantendo-se constante por 5 minutos, totalizando um tempo de 22,25 minutos de análise (Tabela 5.4). O volume de injeção

foi de 1 μ L de uma mistura 1:1 da amostra com o padrão interno (8,0 g·L⁻¹ de hexanol em heptano).

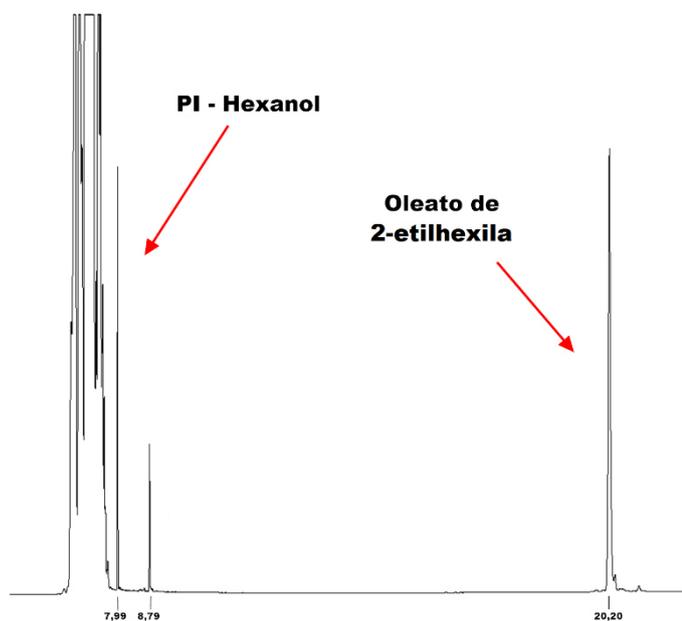
Tabela 5.4 – Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do oleato de 2-etil-hexila.

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.

A Figura 5.3 apresenta o cromatograma obtido após o estabelecimento do método de análise para a quantificação do oleato de 2-etil-hexila.

Figura 5.3 – Cromatograma obtido para quantificação do oleato de 2-etil-hexila.



Fonte: próprio autor.

5.3 Reações de esterificação conduzidas em biorreator de leito fixo

5.3.1 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fixo em simples estágio

Foram avaliadas a influência da razão molar (ácido:álcool) e do tempo espacial (h) na síntese contínua do oleato de 2-etil-hexila realiza em biorreator de leito fixo em simples estágio, na temperatura de 50 °C. O biorreator foi empacotado com 4,3g de lipase de *Candida antarctica* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado com magnetita (CALB-STY-DVB-M).

Nesses experimentos foram testadas razões molares (ácido:álcool) de 4:1 a 1:4, sendo empregados para cada razão molar, os tempos espaciais de 3, 6 e 12 horas, durante 8 dias de operação. O progresso da síntese foi analisado quanto à concentração do éster, o rendimento de esterificação e a produtividade do bioprocessamento. A Tabela 5.5 mostra os valores médios destes três parâmetros para cada condição experimental.

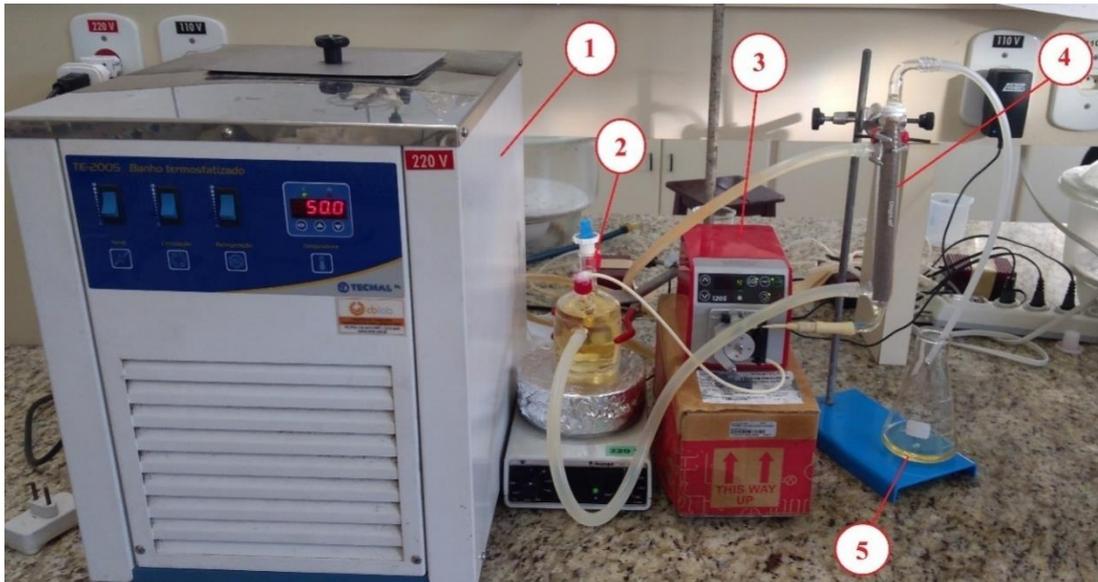
Tabela 5.5 – Valores médios de rendimento, concentração em éster e produtividade obtidos na síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fixo operado continuamente empregando CALB-STY-DVB-M com substratos em diferentes razões (4:1 à 1:4) ediferentes tempos espaciais (3-12 h).

Razão molar Ácido/Álcool	Tempo espacial (h)	Rendimento (%)	Concentração em éster (g L ⁻¹)	Produtividade (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)
4:1	3	56,95 ± 3,10	145,98 ± 7,95	0,344 ± 0,019
	6	63,01 ± 1,20	161,52 ± 3,07	0,190 ± 0,004
	12	82,39 ± 1,69	214,80 ± 5,04	0,127 ± 0,003
2:1	3	37,77 ± 2,40	186,26 ± 11,82	0,439 ± 0,028
	6	54,74 ± 2,96	269,92 ± 14,61	0,318 ± 0,017
	12	72,61 ± 1,57	358,05 ± 7,75	0,211 ± 0,05
1:1	3	34,52 ± 1,07	268,14 ± 8,32	0,632 ± 0,020
	6	49,56 ± 1,57	384,95 ± 12,22	0,454 ± 0,014
	12	60,72 ± 1,27	471,65 ± 10,98	0,278 ± 0,006
1:2	3	48,47 ± 0,99	269,20 ± 5,48	0,634 ± 0,013
	6	53,87 ± 0,60	299,20 ± 3,34	0,353 ± 0,004
	12	63,80 ± 1,95	354,39 ± 10,83	0,209 ± 0,006
1:4	3	53,42 ± 2,22	217,70 ± 9,04	0,513 ± 0,021
	6	67,42 ± 4,58	275,00 ± 18,94	0,324 ± 0,022
	12	83,04 ± 1,24	338,16 ± 5,65	0,199 ± 0,003

Fonte: próprio autor.

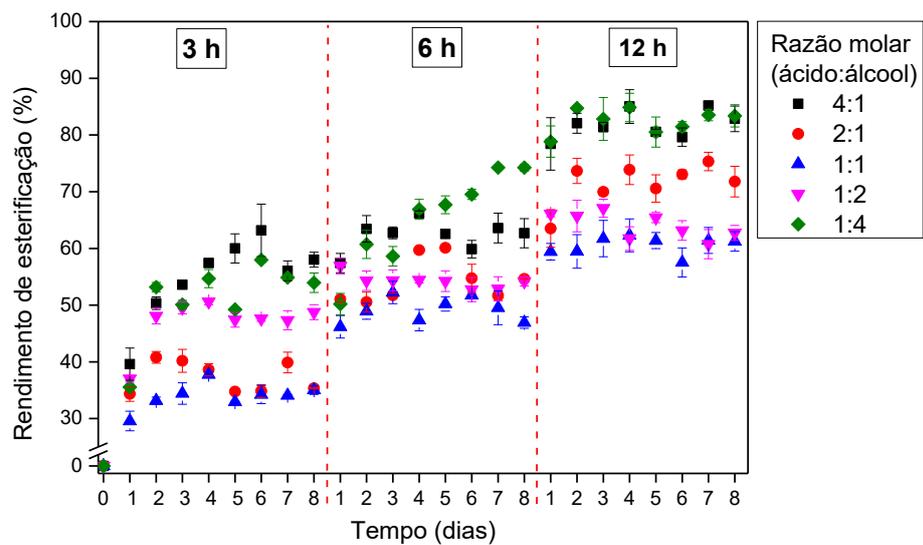
A Figura 5.4 ilustra o aparato experimental utilizado e a Figura 5.5 mostra o rendimento de esterificação do oleato de 2-etil-hexila em diferentes razões molares utilizando diferentes tempos espaciais.

Figura 5.4 – Aparato experimental utilizado para a síntese de oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fixo em simples estágio: 1) Banho termostatzado; 2) Reservatório de substrato; 3) Bomba peristáltica; 4) Coluna de vidro com biocatalisador; 5) Produto coletado.



Fonte: próprio autor.

Figura 5.5 - Rendimento de esterificação do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



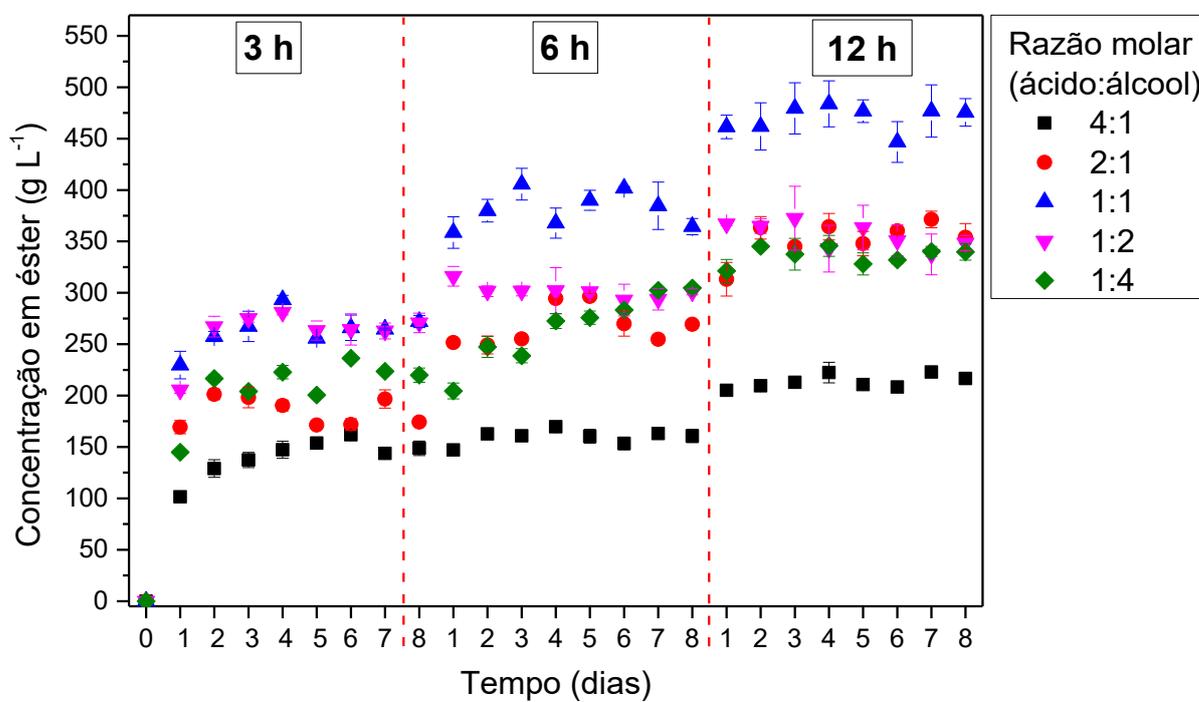
Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 5.5 é possível afirmar que quanto maior o tempo espacial maior foi o rendimento de esterificação obtido para todas as razões molares avaliadas. Este resultado já era esperado, visto que os reagentes permaneceram em contato com o biocatalisador por mais tempo. Contudo, notou-se que, nos testes nos quais foram empregadas razões molares com maiores proporções de um dos reagentes, tanto de álcool quanto de ácido, os rendimentos de esterificação foram mais elevados, na faixa de 80-85%, empregando tempo espacial de 12 horas. Estes resultados podem ser explicados pelo princípio de Le Châtelier, visto que, a maior concentração de um dos reagentes favorece o deslocamento do equilíbrio da reação para a formação de produto.

Resultados similares foram obtidos por Vadgama *et al.* (2015b), que sintetizaram o miristato de isopropila por meio da esterificação do ácido mirístico com álcool isopropílico, em meio isento de solvente em biorreator de leito fixo. A razão molar empregada foi de 1:1 (ácido:álcool), sendo utilizada lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Novozym 435) como biocatalisador, sob temperatura de 60 °C. No tempo de residência de 10 h, foi obtido aproximadamente 60% de conversão. Ao empregar razão molar de 1:3 (ácido:álcool), os autores também observaram o deslocamento do equilíbrio de reação para a formação de produto, atingindo rendimentos da ordem de 75%, no mesmo tempo de residência.

A Figura 5.6 mostra os resultados para a concentração do oleato de 2-etil-hexila a partir da esterificação conduzida de forma contínua em biorreator de leito fixo, nas diferentes condições operacionais testadas.

Figura 5.6 - Concentração do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 5.8, observa-se que quanto maior o tempo espacial, maior também foi a concentração de éster obtida para todas as razões molares testadas, sendo a condição de razão molar 1:1, a que obteve a maior concentração de éster, atingindo cerca de 450-500 g L⁻¹ de oleato de 2-etil-hexila, seguida pelas razões molares 2:1, 1:2, e 1:4, com concentrações de éster na faixa de 300-350 g L⁻¹. Os menores valores foram obtidos quando empregou-se razão molar de 4:1, chegando a apenas 200-225 g L⁻¹.

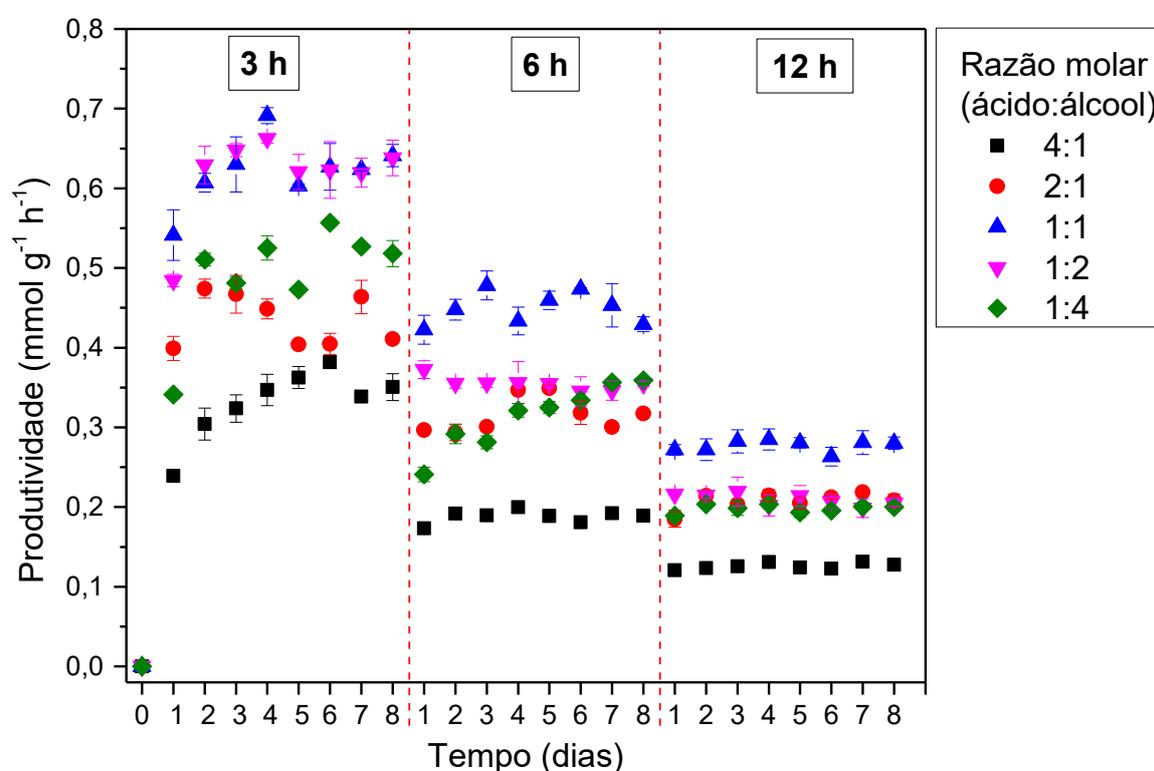
Esses resultados podem ser explicados pela diluição do produto e do reagente limitante pelos reagentes em excesso, principalmente pelo ácido oleico, que é uma molécula grande e de elevado peso molecular. Nos testes nos quais foram empregados excesso de ácido oleico, a maior fração mássica do meio reacional era constituída por esse ácido, que diluiu o reagente limitante (álcool) e o produto formado, diminuindo assim, a concentração do éster formado. Quando empregou-se a razão molar de 1:1 não houve diluição do reagente limitante, favorecendo uma maior concentração de éster obtida em todos os experimentos.

Com relação a produtividade do processo (Figura 5.7) constatou-se que os maiores valores (0,541 - 0,691 mmol g⁻¹ h⁻¹) também foram obtidos no tempo espacial de 3h e nas

razões molares mais próximas da estequiométrica, isto porque a maior concentração do reagente limitante e menor quantidade de água e produtos, num menor tempo, resultam em maiores taxas de reação, produzindo maior quantidade de éster por tempo.

Como mostrado na Figura 5.7, dentre todas as razões molares testadas, com tempo espacial de 12 horas, a maior produtividade foi obtida quando utilizou-se a razão molar de 1:1, atingindo produtividades de 0,263 – 0,285 $\text{mmol g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

Figura 5.7 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor.

Resultados similares foram obtidos por Chang *et al.* (2007), que sintetizaram o laurato de hexila por meio da esterificação do ácido láurico e hexanol em meio hexano, na razão molar (ácido:álcool) 2:1, em biorreator de leito fixo. Ao aumentar a vazão do substrato de 1,5 mL min^{-1} para 4,5 mL min^{-1} (ou seja, diminuindo o tempo de residência), a taxa de produção do éster praticamente triplicou, passando de 125 $\mu\text{mol min}^{-1}$ para 375 $\mu\text{mol min}^{-1}$.

No atual trabalho, a condição empregando razão molar de 1:1 e tempo espacial de 12 horas foi selecionada como a mais adequada para a síntese do oleato de 2-etil-hexila, visto

que, foi a condição que obteve a maior concentração de éster e produtividade considerável. Destaca-se que uma elevada concentração de éster é fundamental para viabilizar economicamente o processo, devido a maior facilidade de purificação do produto. Além disso, após a purificação do produto, os reagentes residuais podem ser reutilizados no processo, retornando para a alimentação do biorreator (CLARKE, 2013; LONG *et al.*, 2018).

5.3.1.1 Estabilidade operacional do sistema experimental empregando biorreator de leito fixo em simples estágio

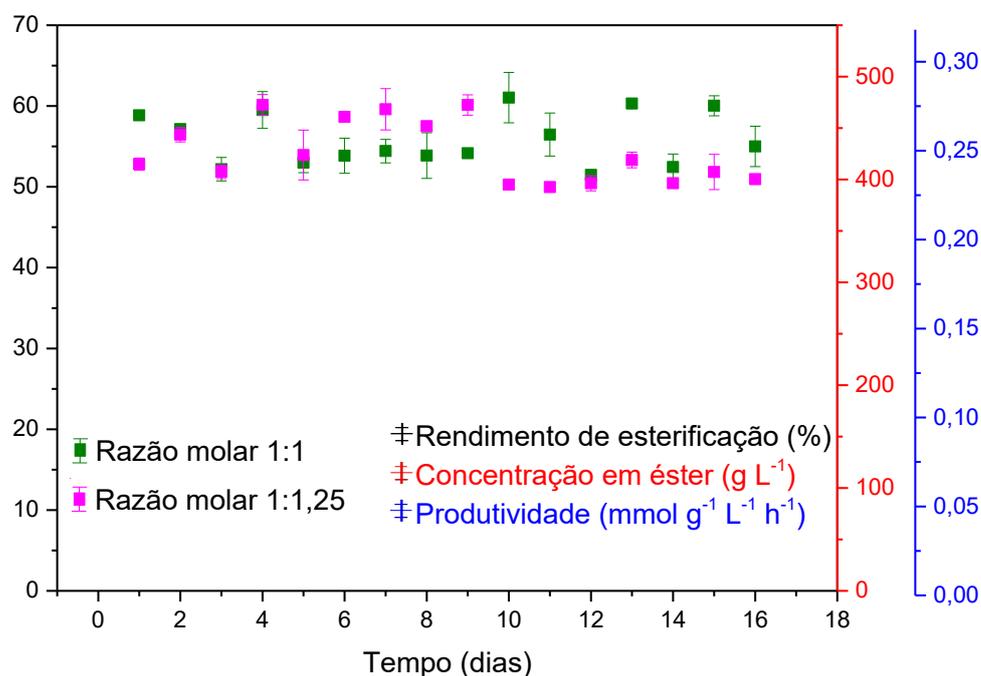
Foram realizados dois testes para avaliar a estabilidade operacional do biorreator de leito fixo, um com razão molar 1:1 e outro 1:1,25 (ácido:álcool). Esta última condição foi testada visando verificar se um pequeno excesso de um dos reagentes iria elevar a formação do éster. Além disso, o 2-etil-hexanol possui menor viscosidade quando comparado ao ácido oleico, e essa menor viscosidade do meio reacional, favorece a difusão das moléculas, aumentando o grau de mistura e facilitando a operação do bioprocessamento.

A Figura 5.8 mostra o rendimento de esterificação, a concentração do éster formado e a produtividade nos dois testes realizados. Pode-se notar que em ambos os testes, o rendimento de esterificação, a concentração em éster e a produtividade do bioprocessamento mantiveram-se praticamente constantes ao longo dos 16 dias de operação.

Empregando-se a proporção estequiométrica da esterificação, o tempo de meia-vida do biocatalisador foi estimado em 2063 h (86 dias), apresentando constante de desativação (K_d) igual a $3,36 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, e quando utilizou-se razão molar 1:1,25 (ácido:álcool), o tempo de meia-vida foi de 1851 h (77 dias) e constante de desativação $K_d = 3,74 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, não sendo constatadas diferenças relevantes nas duas condições experimentais avaliadas, mostrando que o sistema operacional é bastante estável.

Resultados similares foram obtidos por Vilas Bôas *et al.* (2018) que utilizaram a lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em suporte comercial (HP 20 Daion) para sintetizar o laurato de isoamila por meio da esterificação do ácido láurico e álcool isoamílico em meio isoctano, em biorreator de leito fixo operado continuamente. Os autores constataram que a concentração do éster praticamente não variou significativamente em 173 h de operação, obtendo tempo de meia vida de 285 h.

Figura 5.8 – Estabilidade operacional da CALB-STY-DVB-M na síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em modo contínuo em biorreator de leito fixo.



Fonte: próprio autor.

Pires-Cabral *et al.* (2010) empregaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em espuma de poliuretano (HYPOL FHP 5000) na síntese contínua do butirato de etila, por meio da esterificação do ácido butírico e etanol em meio, conduzida em biorreator de leito fixo, sob 30 °C, e constataram tempo de meia-vida de 170 horas.

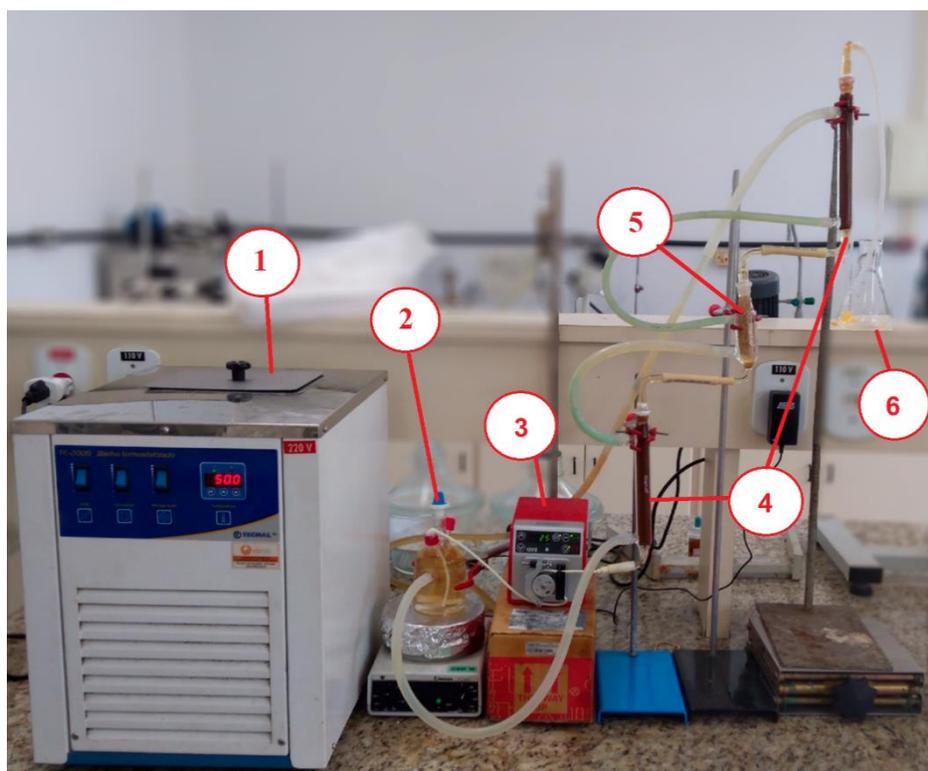
Silva *et al.* (2018a) empregaram o mesmo biocatalisador deste trabalho, lipase de *Candida antarctica* imobilizada em poli(estireno-co-divinilbenzeno) para a síntese de miristato de isopropila, por meio da esterificação de ácido mirístico e isopropanol, na razão molar (ácido:álcool) 1:15, em biorreator de leito fixo operado continuamente, sendo constatado um tempo de meia-vida de 875 horas, tempo inferior ao obtido no presente trabalho. Esta diferença pode ser explicada pela elevada polaridade do isopropanol ($\log P = 0,16$), que pode ter alterado a camada de hidratação da lipase (quantidade de água essencial para sua atuação catalítica) em função do tempo de reação, reduzindo o poder de catálise da lipase e diminuindo o seu tempo de meia-vida em relação ao sistema experimental apresentado neste trabalho, em que foi utilizado 2-etil-hexanol ($\log P = 2,72$) (STERGIOU *et al.*, 2013).

5.3.2 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fixo em duplo estágio empregando coluna extratora de água

Neste teste foi empregada a razão molar de 1:1, pois, como dito anteriormente, foi a melhor condição avaliada para a síntese do oleato de 2-etil-hexila. Este sistema foi composto por dois biorreatores de leito fixo e uma coluna extratora de água, contendo peneira molecular. Cada estágio foi operado com tempo espacial de 6 horas, sendo considerado 12 horas o tempo espacial total, devido a soma dos dois biorreatores, a fim de comparar com os resultados obtidos no item 5.3.1.

A Figura 5.9 mostra o aparato experimental utilizado para a obtenção do éster emoliente.

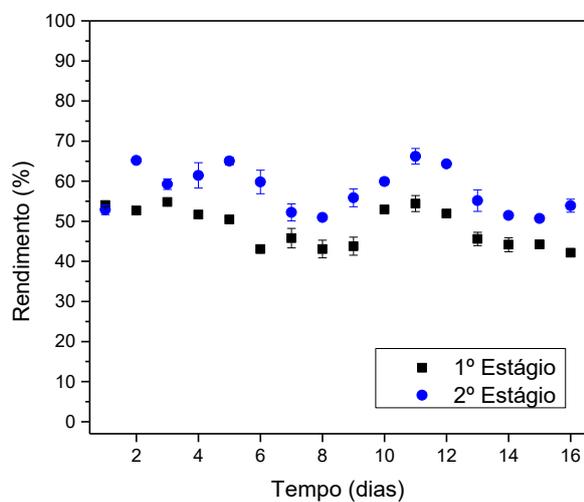
Figura 5.9 – Aparato experimental utilizado na síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fixo em duplo estágio com coluna extratora: 1) Banho termostatzado; 2) Reservatório de substrato; 3) Bomba peristáltica; 4) Colunas de vidro com biocatalisador; 5) Coluna extratora com peneiras moleculares; 6) Produto coletado.



Fonte: próprio autor.

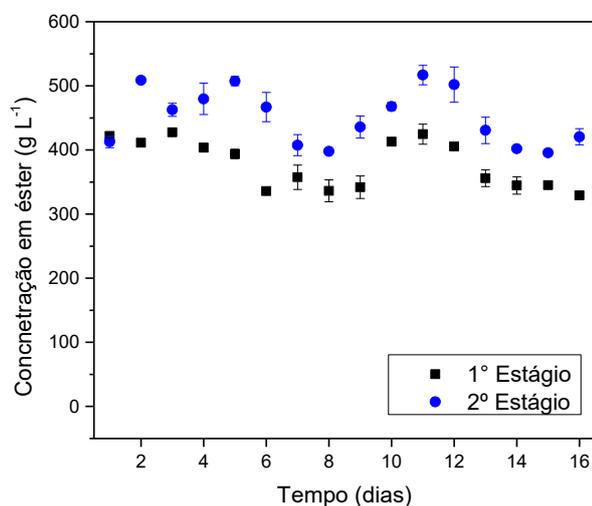
As Figuras 5.10, 5.11 e 5.12 mostram o rendimento de esterificação, a concentração do éster e a produtividade do processo, para cada um dos estágios avaliados, respectivamente.

Figura 5.10 – Rendimento do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em duplo estágio empregando coluna extratora de água, utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



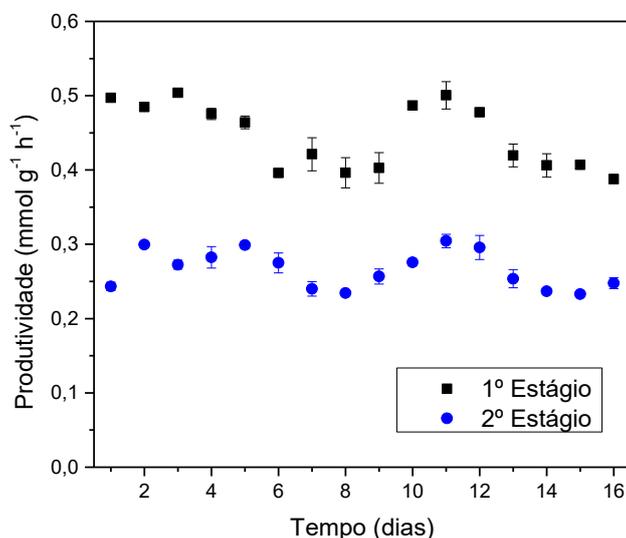
Fonte: próprio autor.

Figura 5.11 - Concentração do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em duplo estágio empregando coluna extratora de água, utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: próprio autor.

Figura 5.12 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em duplo estágio empregando coluna extratora de água, utilizando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



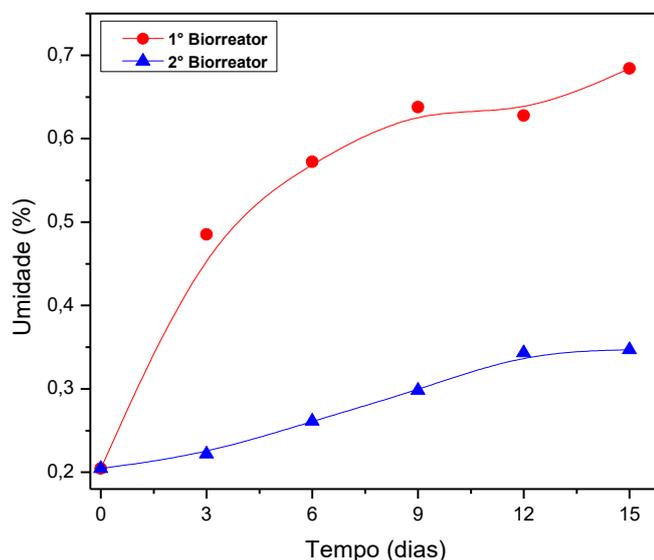
Fonte: próprio autor.

Comparando os resultados obtidos com os do item 5.3.1, a utilização do duplo estágio e da coluna extratora de água não favoreceu a síntese do éster de forma relevante, visto que, o rendimento de esterificação médio obtido quando empregou-se o simples estágio foi de 55,62%, enquanto que no duplo estágio com coluna extratora de água, foi de 57,77%. A concentração em éster e a produtividade dos bioprocessos também foram muito similares.

Para este sistema reacional realizado em duplo estágio, foi calculado o tempo de meia-vida para o biocatalisador do segundo biorreator, revelando um tempo de 2294 h (96 dias) e constante de desativação (K_d) igual a $3,02 \cdot 10^{-4} \text{ h}^{-1}$, observando-se uma melhora de 11,24% em relação ao sistema operacional em simples estágio.

A Figura 5.13 mostra um comparativo entre o teor de umidade presente no efluente dos 2 biorreatores analisados neste sistema experimental.

Figura 5.13 – Comparação do teor de umidade presente no efluente dos biorreatores de leito fixo em duplo estágio na síntese contínua do oleato de 2-etil-hexila empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: próprio autor.

Analisando a Figura 5.13, observa-se que houve um decréscimo no teor de umidade no efluente do 2º biorreator empregado no sistema em duplo estágio (representado pela linha azul), em comparação ao primeiro biorreator (representado pela linha vermelha), confirmando que a coluna extratora de umidade, removeu parte da água do meio reacional. No entanto, essa redução da umidade no meio reacional não evidenciou nenhum acréscimo relevante no rendimento, concentração ou na produtividade do bioprocessamento, visto que esses valores permaneceram muito baixos (<1%).

Além disso, este resultado pode ser explicado pela baixa afinidade do suporte utilizado (hidrofóbico) pela água, que em outros casos, como em suportes hidrofílicos, pode modificar a interação entre o substrato e a quantidade de água essencial ao redor da enzima, limitando a migração para a fase sólida, ocasionando em menor atividade catalítica do biocatalisador (STERGIOU *et al.*, 2013; VILAS BÔAS *et al.*, 2017).

Por outro lado, o acúmulo da água pode ser prejudicial em sistemas reacionais que operem por longos períodos de tempo, sendo necessário um sistema para retirada de água em tempos pré-determinados.

Ressalta-se que a separação da água da fase orgânica pode ser desconsiderada no cálculo do rendimento da reação, visto que a quantidade de água formada pode chegar ao

máximo de 4,36 % da fração mássica do produto, considerando 100% de conversão dos reagentes em éster e água. Além disso, sabe-se que parte da água formada está miscível no produto, como foi observado nos resultados previamente apresentados.

A Figura 5.14 apresenta uma amostra do efluente coletado do biorreator de leito fixo, sendo possível observar a separação das fases.

Figura 5.14—Amostra do efluente coletado do biorreator de leito fixo, com destaque para a fase aquosa que se separou da fase orgânica.



Fonte: próprio autor.

Por fim, julga-se que, apesar da melhora observada na estabilidade operacional do biocatalisador e de uma pequena redução na umidade do efluente presente no 2º biorreator, a utilização de biorreatores em duplo estágio empregando coluna extratora de água torna-se inviável para o bioprocessamento avaliado, visto que são necessários mais equipamentos, além do elevado custo da peneira molecular.

5.4 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fluidizado

Visando aprimorar os resultados obtidos em reator de leito fixo, objetivou-se avaliar o desempenho do biocatalisador na síntese do éster emoliente em reator de leito fluidizado. Esse biorreator apresenta como vantagem elevada transferência de massa, e diferentemente do PBR, a utilização de partículas pequenas de biocatalisador não ocasiona queda de pressão no leito, sendo menos susceptível a formação de caminhos preferenciais (FENG *et al.*, 2013; POPPE *et al.*, 2015).

5.4.1 Testes de expansão do leito fluidizado

Inicialmente, foi realizado o teste de expansão do leito para determinação da velocidade superficial do fluido (mínima de fluidização), e calcular a altura mínima do reator de leito fluidizado para que foi possível operá-lo sem a necessidade de reciclo de substrato.

Os ensaios foram realizados em um reator de coluna de vidro com altura de 202 mm e diâmetro de 15 mm e com volume útil de 35,70 mL. A razão molar do substrato foi de 1:1 (ácido:álcool). Primeiramente, foi medida a altura do leito em função da vazão empregada e da massa de biocatalisador, conforme Tabela 5.6.

Tabela 5.6 – Altura do leito do biorreator de leito fluidizado em função da massa de biocatalisador e vazão empregadas.

Vazão (mL·min ⁻¹)	Altura do leito (cm)			
	1,0 g de biocatalisador	1,5 g de biocatalisador	2,0 g de biocatalisador	2,5 g de biocatalisador
0	4,3	6,4	8,6	10,8
0,0532	4,3	6,4	8,6	10,8
0,1313	4,3	6,4	8,8	10,9
0,2674	4,5	6,7	9,7	12,9
0,5456	5,5	7,6	10,8	15
0,8333	5,9	8,2	11,7	16,6
1,2222	6,5	9,6	15,2	18,3
1,6443	7,3	10,9	18,6	20
2,0542	9,3	12,1	20,2*	20,2*
2,7389	11,7	13,8	20,2*	20,2*
3,3929	12,8	16	20,2*	20,2*
4,0222	15,8	18,7	20,2*	20,2*
4,7111	18,4	20,2*	20,2*	20,2*

*altura máxima da coluna

Fonte: próprio autor.

Assim foi calculada a porosidade do leito para cada condição testada em função da velocidade superficial do fluido, sendo os dados obtidos dispostos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7 – Porosidade do leito fluidizado em função da massa de biocatalisador e velocidade superficial do fluido.

u ($\text{cm}\cdot\text{min}^{-1}$)	Porosidade do leito			
	1,0 g de biocatalisador	1,5 g de biocatalisador	2 g de biocatalisador	2,5 g de biocatalisador
0,0000	0,881437	0,880511	0,881437	0,881986
0,0346	0,881437	0,880511	0,881437	0,881986
0,0853	0,881437	0,880511	0,884132	0,883069
0,1737	0,886707	0,885861	0,894883	0,901198
0,3544	0,907306	0,899378	0,905589	0,91503
0,5413	0,91359	0,90674	0,912851	0,92322
0,7939	0,921566	0,920341	0,932919	0,930353
1,0681	0,930162	0,929841	0,945181	0,936273
1,3344	0,945181	0,936799	0,949523	0,936904
1,7792	0,956426	0,944585	0,949523	0,936904
2,2040	0,96017	0,952204	0,949523	0,936904
2,6128	0,967733	0,959105	0,949523	0,936904
3,0603	0,972292	0,962142	0,949523	0,936904

Fonte: próprio autor.

Analisando a Tabela 5.7 foi observado que a porosidade do leito é praticamente constante para as diferentes massas de biocatalisador utilizada, e varia em função da vazão testada.

Empregando os dados da Tabela 5.7 na Equação 4.4 e executando a regressão linear pelo software Origin 9.0, foi possível obter os valores para o coeficiente de expansão $\eta = 41,76$ e de velocidade terminal da partícula, corrigida pelo efeito da parede da coluna, $u_{tc} = 13,92 \text{ cm min}^{-1}$. Sendo assim, utilizando o valor médio de porosidade para a velocidade mínima de fluidização ($\epsilon_{\min} = 0,8813$) e substituindo na Equação 4.5, foi obtida a velocidade superficial mínima de fluidização (u_{\min}) de $0,07108 \text{ cm min}^{-1}$ (vazão mínima de fluidização = $0,1256 \text{ mLmin}^{-1}$).

O valor do coeficiente de expansão obtido é considerado elevado, sendo assim, o biocatalisador se expande muito facilmente através da coluna do biorreator de leito fluidizado. Além disso, a velocidade superficial mínima de fluidização é relativamente pequena, o que implica numa facilidade do biocatalisador em se fluidizar. Estes resultados podem ser explicados pela baixa densidade aparente das partículas deste biocatalisador que é composto à base de estireno (densidade aparente = $0,801 \text{ g mL}^{-1}$).

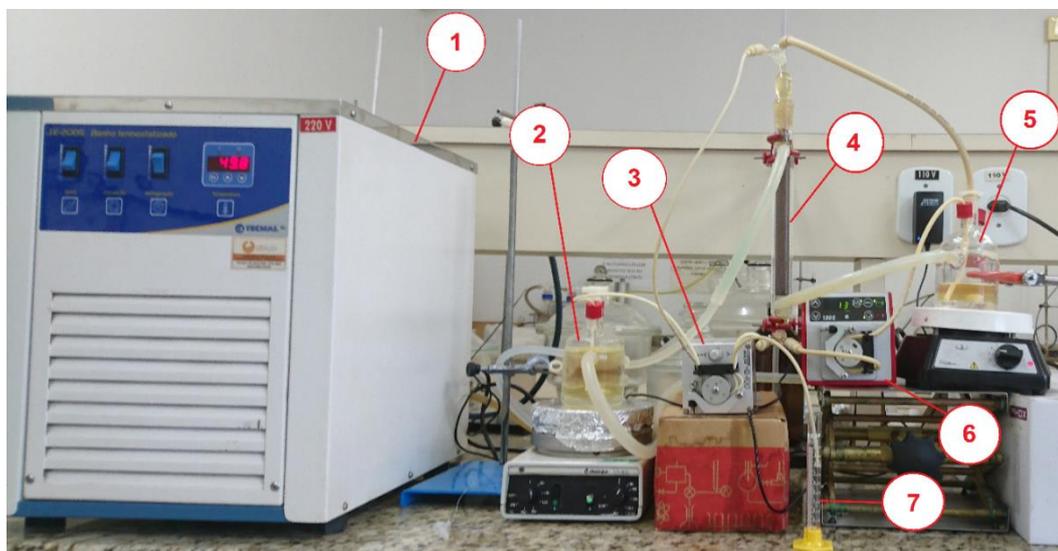
Fidalgo *et al.* (2016) utilizaram o biocatalisador Novozym 435, que é formado pela lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em resina acrílica, e em teste de expansão do leito, encontrou o valor de $u_{\min} = 1,16 \text{ cm min}^{-1}$ e $\eta = 7,4$ e $u_{tc} = 22,9 \text{ cmmin}^{-1}$. Esses resultados evidenciam que o biocatalisador de CALB-STY-DVB-M possui uma u_{\min} relativamente similar ao da Novozym 435, porém seu fator de expansão é muito maior, provavelmente devido à sua composição à base de estireno e divinilbenzeno.

A altura mínima do leito necessária para realizar o processo sem reciclo do meio reacional seria de 581 mm com diâmetro de 15 mm, que corresponde a um volume útil do reator de 102,67 mL. Entretanto, a condução do bioprocessamento foi realizada com reciclo, visto que, seria necessário empregar uma vazão $0,126 \text{ mL min}^{-1}$ demandando, aproximadamente, 2,9 L de substrato para cada 16 dias de operação, o que elevaria os custos do processo e inviabilizaria a continuidade da pesquisa.

5.4.2 Variação da porosidade do leito na síntese do oleato de 2-etil-hexila

Selecionando-se então as porosidades de 0,866, 0,892 e 0,916 foram realizados testes da reação de esterificação para a síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fluidizado. Esses valores de porosidade foram escolhidos devido à maior adequação do biocatalisador no interior do leito fluidizado, proporcionando elevado contato entre o substrato e o biocatalisador, além de permitir boa fluidização do meio reacional. A Figura 5.15 mostra o esquema experimental utilizado.

Figura 5.15 – Aparato experimental utilizando no biorreator de leito fluidizado: 1 – Banho termostatzado; 2 – Reservatório de substrato; 3 – Bomba peristáltica para substrato; 4 – Coluna de vidro; 5 – Reservatório do reciclo do substrato; 6 – Bomba peristáltica para reciclo do substrato; 7 – Coleta do produto.



Fonte: próprio autor.

Nesta configuração de biorreator foram realizados diferentes ensaios para avaliar a influência da porosidade do leito sobre o rendimento de reação, concentração em éster e produtividade. Para cada valor de porosidade selecionada (0,866, 0,892 e 0,916), foram avaliados 3 tempos espaciais 6, 12 e 18 horas, em que cada experimento foi operado durante 8 dias ininterruptos. A Tabela 5.8 mostra as condições utilizadas nestes experimentos.

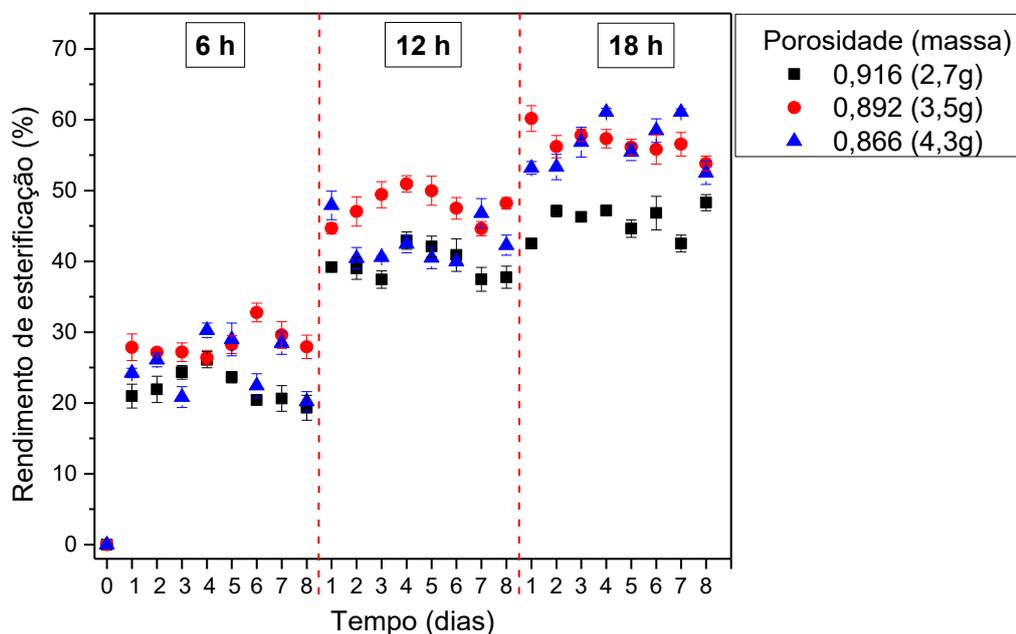
Tabela 5.8 – Condições experimentais utilizadas no biorreator de leito fluidizado para avaliar a influência da porosidade do leito.

Parâmetro	Valor		
Temperatura (°C)	50	50	50
Razão molar (ácido:álcool)	1:1	1:1	1:1
Porosidade	0,916	0,892	0,866
Carregamento catalítico (g mL ⁻¹)	0,076	0,098	0,120
Massa de CALB-STY-DVB-M (g)	2,7	3,5	4,3
Vazão de alimentação e efluente (mL min ⁻¹)	0,030, 0,045 e 0,091	0,029, 0,044 e 0,088	0,029, 0,043 e 0,086
Tempo espacial (h)	6, 12 e 18	6, 12 e 18	6, 12 e 18
Vazão de recirculação (mL min ⁻¹)	1,40	0,70	0,32

Fonte: próprio autor.

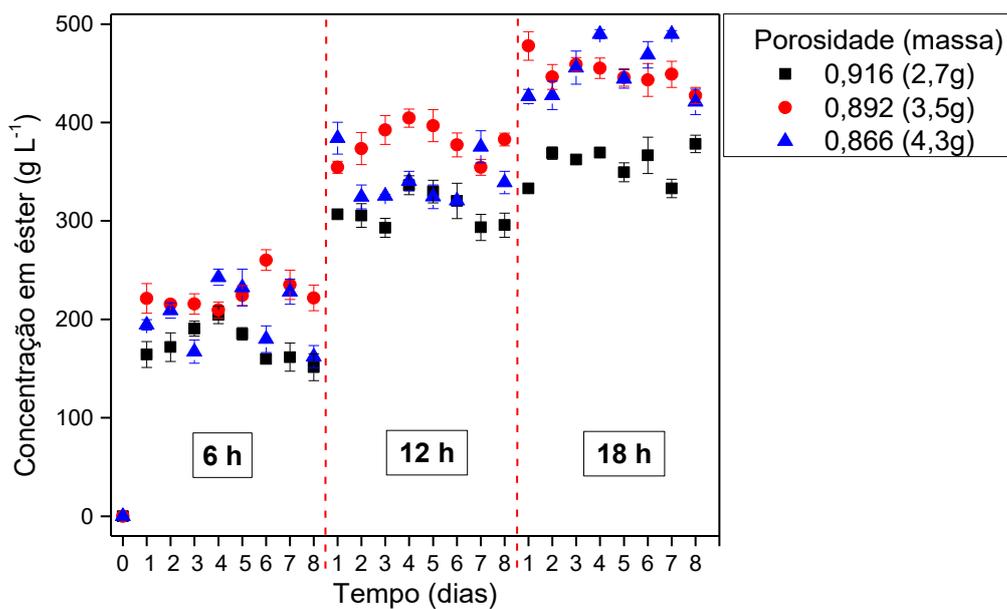
As Figuras 5.16, 5.17 e 5.18 mostram os resultados de rendimento de esterificação, concentração em éster e produtividade para os testes que variaram a porosidade do leito em diferentes tempos espaciais no biorreator de leito fluidizado.

Figura 5.16 - Rendimento de esterificação do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fluidizado empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



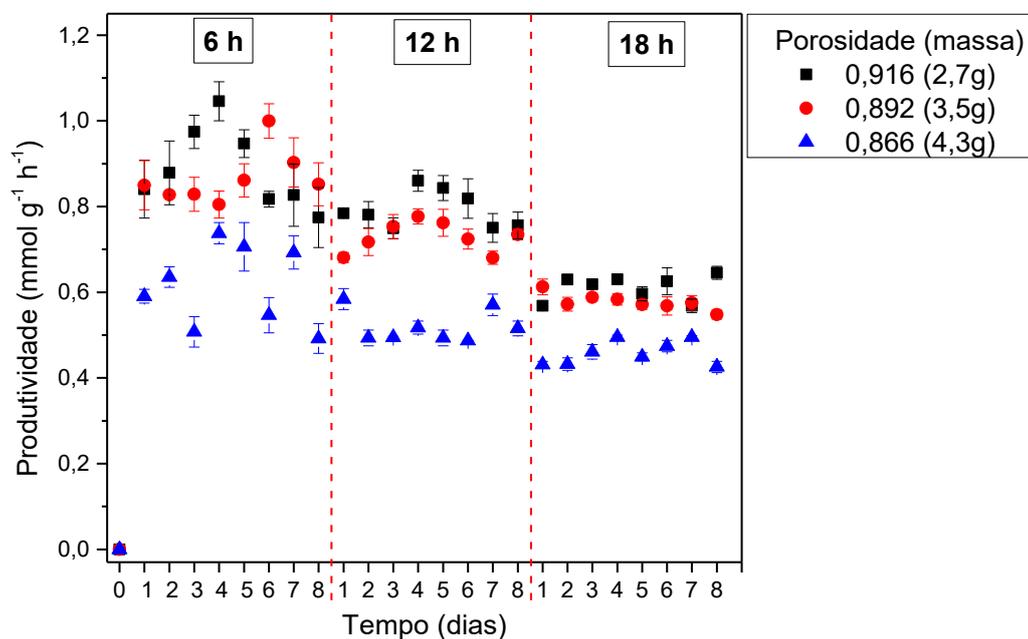
Fonte: próprio autor.

Figura 5.17 - Concentração do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fluidizado empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: próprio autor.

Figura 5.18 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila na síntese contínua conduzida em biorreator de leito fixo, em simples estágio, empregando CALB-STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: próprio autor.

Analisando as Figuras 5.16 a 5.18 é possível notar que o sistema experimental se apresentou bastante estável, operando durante 8 dias com rendimentos, concentrações e produtividades satisfatórias.

Observa-se que, quanto maior o tempo espacial empregado, maior o rendimento da reação, o que é justificado pelo maior tempo de contato entre a enzima e o substrato, favorecendo a formação do produto. Por outro lado, quanto maior o tempo espacial, menor a produtividade do bioprocessamento, visto que essa grandeza é uma relação de concentração dividida por tempo de reação.

Em relação à influência da porosidade do leito na síntese do éster, observa-se que quanto maior a porosidade, maiores são os valores de produtividades do bioprocessamento nos menores tempos espaciais, atingindo valores superiores a 1,0 mmol g⁻¹ h⁻¹ quando foi empregada porosidade de 0,916 e tempo especial de 6h. Este fato pode ser explicado pela maior taxa de transferência de massa no interior do leito, devido a elevada velocidade intersticial (1,359 x 10⁻⁴ m s⁻¹). No entanto, nestas condições foram obtidos rendimentos de esterificação muito baixos, variando de 19 a 48 %, o que dificulta as etapas de purificação do produto, devido ao excedente de reagente não consumido. Rendimentos mais elevados foram encontrados nas menores porosidades do leito, entretanto, foram obtidas produtividades muito baixas.

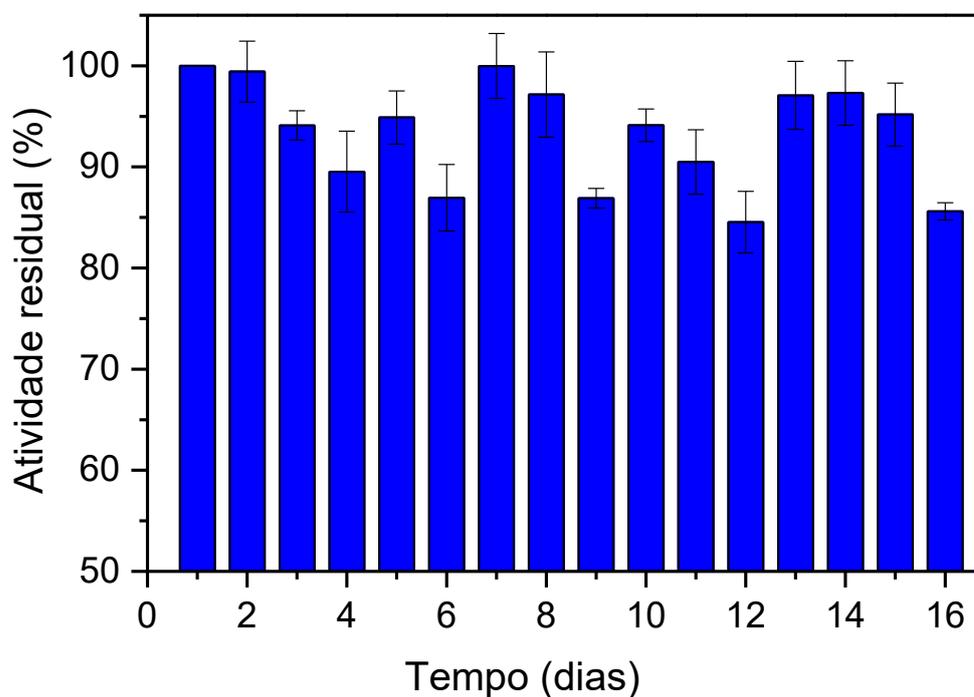
Dessa forma, valores aceitáveis de rendimento (superior a 50%), concentração (média de 380 g L⁻¹) e produtividade em éster (média de 0,73 mmol g⁻¹ h⁻¹) foram obtidos quando utilizou-se porosidade de 0,892 e tempo espacial de 12h, sendo esta condição selecionada como a mais adequada para a síntese do oleato de 2-etil-hexila no sistema experimental avaliado.

Damjanović *et al.* (2012) utilizaram um biorreator de leito fluidizado para sintetizar o butirato de geranila, por meio da esterificação do ácido butírico e geraniol, empregando biocatalisador obtido pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em Sepabeads[®], sendo empregadas diferentes condições de razão molar (ácido:álcool): 1:1, 1:1,6 e 1:2. Assim como no presente trabalho, a razão molar estequiométrica foi selecionada como a mais adequada, obtendo conversões molares entre 30% a 50% do substrato, apresentando elevadas produtividades. Também foram realizados testes variando a vazão de alimentação em 2,67, 3,70 e 10 mL min⁻¹, sendo observado que quanto maior a vazão de alimentação e, conseqüentemente, maior velocidade instericial, mais elevadas eram as produtividades em éster, no entanto, eram obtidas as menores conversões reacionais, assim como observado no presente estudo.

5.4.3 Estabilidade operacional

A estabilidade operacional do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) em STY-DVB-M foi avaliada na síntese do oleato 2-etil-hexila conduzida durante 16 dias em modo contínuo em biorreator de leito fluidizado. Para a realização desse teste foi empregada a melhor condição experimental avaliada, porosidade de 0,892 e 12 horas de tempo espacial. A Figura 5.19 mostra a atividade residual do biocatalisador empregado na síntese do oleato de 2-etil-hexila durante os 16 dias de operação.

Figura 5.19 - Estabilidade operacional da CALB-STY-DVB-M na síntese do oleato de 2-etilhexila conduzida em modo contínuo em biorreator de leito fluidizado.



Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 5.19 é possível observar que o sistema mostrou-se bastante estável, e após 16 dias de operação o biocatalisador ainda mantinha aproximadamente 86% da sua atividade inicial. O rendimento de esterificação manteve-se na faixa de 43 a 51%, a concentração em éster de 341 a 403 g L⁻¹, e a produtividade de 0,65 a 0,77 mmol g⁻¹ L⁻¹.

O tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) calculado foi de 1714h (142 ciclos) e o coeficiente de desativação (K_d) foi igual a $4,04 \times 10^{-4}$ h⁻¹. O elevado $t_{1/2}$ obtido demonstra que o biocatalisador apresenta grande potencial para ser empregado em processos industriais.

Resultados semelhantes foram encontrados por Remonatto *et al.* (2023) que realizaram um teste de estabilidade operacional do biocatalisador Lipozyme RM IM, lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca aniônica macroporosa, em reator de leito fluidizado, operado continuamente, para a síntese de triacilgliceróis a partir do óleo de semente de algodão e ácido cáprico, sob 45°C. Nesse estudo os autores encontraram um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 2545,78 h com coeficiente de desativação (K_d) de $2,72 \times 10^{-4}$ h⁻¹, o que corresponde a 80 ciclos de operação. É válido destacar que o biocatalisador empregado por esses autores é uma preparação comercial de lipase imobilizada, diferentemente do

biocatalisador utilizado no presente trabalho, que foi obtido de forma experimental no Laboratório de Biocatálise da EEL.

Shu *et al.* (2011) utilizaram a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em tecido de algodão para sintetizar o butirato de etila por meio da esterificação do ácido butírico e etanol, em biorreator de leito fixo operado de modo descontínuo sob temperatura de 25°C, e obtiveram $t_{1/2} = 300\text{h}$ para o biocatalisador, valor este, inferior ao encontrado no presente estudo.

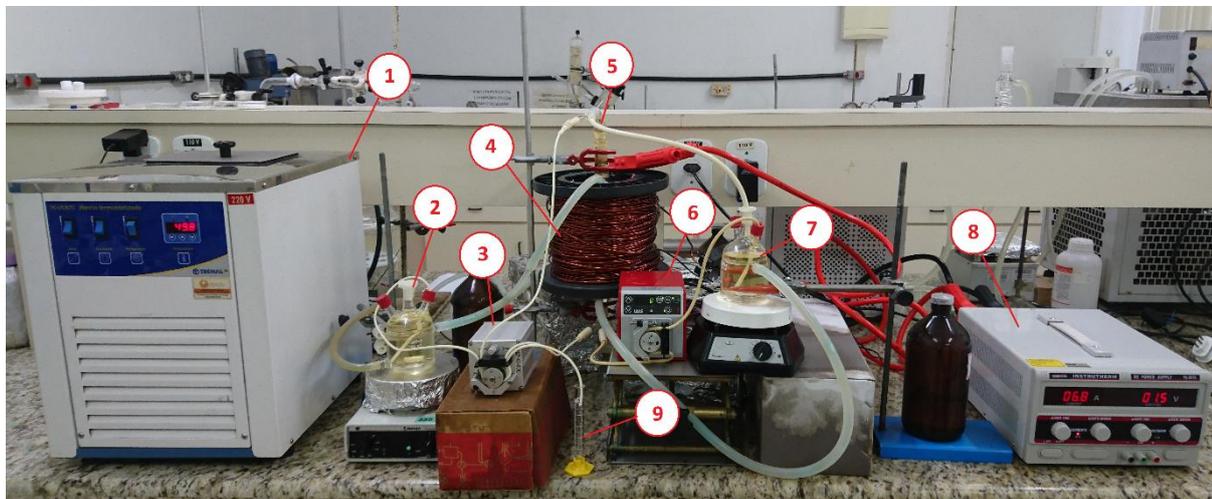
Comparando os melhores resultados obtidos pelo biorreator de leito fixo e fluidizado, nota-se que, apesar do biocatalisador empregado no bioprocesso que utilizou o reator de leito fluidizado ter apresentado um tempo de meia-vida 20% inferior ao obtido no leito fixo, o sistema experimental que empregou o leito fluidizado demonstrou valores de produtividades 60% superiores ao leito fixo, resultados estes, justificados pelo maior grau de mistura do meio reacional no leito fluidizado.

Além disso, o biorreator de leito fluidizado opera com menor quantidade de biocatalisador, aproximadamente 23% menos massa, comparado ao biorreator de leito fixo, o que é um fator determinante para a implementação do bioprocesso, visto que reduz o custo de operação.

5.5 Síntese do oleato de 2-etil-hexila conduzida em biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR)

A condição considerada mais adequada para a síntese do oleato de 2-etil-hexila em biorreator de leito fluidizado foi escolhida para ser empregada no MSFBR. Neste sistema experimental foi empregado tempo espacial de 12h e porosidade de 0,892, sendo a intensidade do campo magnético variada (5, 10 e 15 mT). Em cada condição o biorreator foi operado por 8 dias ininterruptos, sendo selecionados como parâmetros importantes de análise, o rendimento da reação, a concentração em éster e sua produtividade. A Figura 5.20 mostra o aparato experimental do biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente.

Figura 5.20 – Aparato experimental utilizando no biorreator de leito fluidizado: 1 – Banho Termostatizado; 2 – Reservatório de Substrato, 3 e 6 – Bombas peristálticas, 4 – Solenoide; 5 – Coluna do Biorreator; 7 – Reservatório do reciclo; 8 – Fonte de alimentação; 9 – Coleta do Produto.



Fonte: Próprio autor.

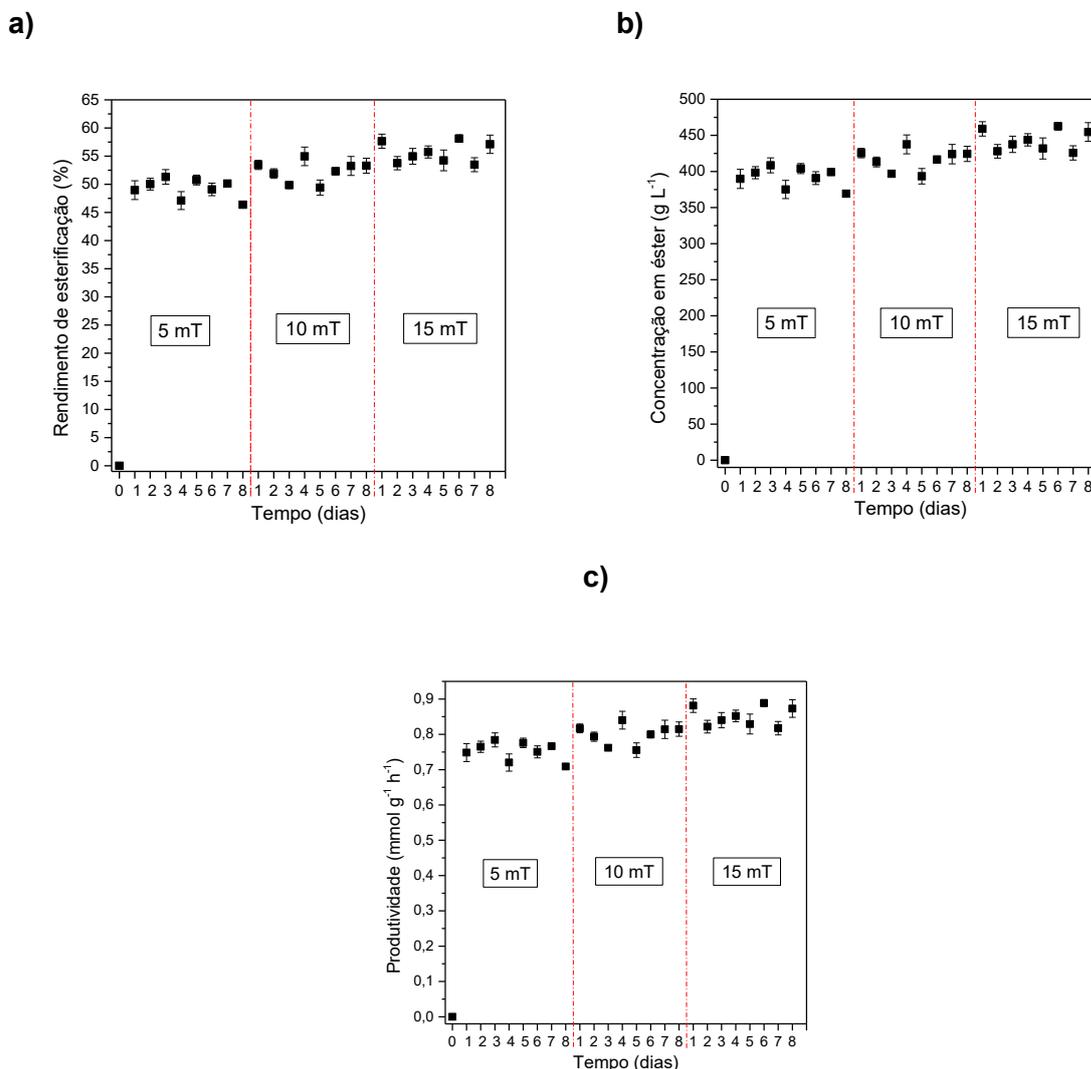
A Tabela 5.9 e a Figura 5.21 mostram a média do rendimento de esterificação, a concentração e a produtividade em éster obtidos.

Tabela 5.9 - Valores médios de rendimento, concentração e produtividade em éster obtidos no MSFBR operado continuamente empregando CALB-STY-DVB-M em diferentes intensidades de campo magnético.

Intensidade do campo magnético (mT)	Rendimento (%)	Concentração em éster (g L ⁻¹)	Produtividade (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)
5	49,26 ± 1,48	392,16 ± 10,65	0,752 ± 0,020
10	52,14 ± 1,50	415,13 ± 11,46	0,800 ± 0,022
15	55,35 ± 1,41	440,63 ± 12,13	0,850 ± 0,023

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.21 – Síntese do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR variando a intensidade do campo magnético: a) Rendimento de esterificação; b) Concentração em éster e c) Produtividade.



Fonte: Próprio autor.

Analisando a Figura 5.21 é possível observar que o rendimento de esterificação, concentração e produtividade em éster foram incrementados proporcionalmente à intensidade do campo magnético aplicado. Ao empregar 5 mT, 10mT e 15mT, esses parâmetros foram incrementados, respectivamente, em 2,11%, 8,08% e 14,74%, quando comparados com o biorreator de leito fluidizado. Isto evidencia que o MSFBR proporciona um maior grau de agitação e mistura no biorreator, elevando a taxa de velocidade da reação. Sendo assim a condição que empregou 15 mT de intensidade de campo magnético foi considerada a mais adequada para síntese do éster emoliente.

Atualmente, há uma escassez de dados na literatura a respeito da utilização deste tipo de biorreator, o que dificulta a comparação com outros trabalhos e constata a relevância do

presente trabalho na obtenção de dados e informações no que tange a implementação e operação do MSFBR em Biocatálise.

Em trabalho realizado por Cubides-Roman *et al.* (2017), na qual utilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em quitosana com propriedades magnéticas para catalisar a síntese de ésteres etílicos por meio da transesterificação de etanol e óleo de coco (razão molar óleo/etanol 1:12, temperatura de 50°C) em um MSFBR, obtiveram apenas 5,89% de rendimento ao empregar 6,5 mT e 7,86% quando empregou-se 13 mT, constatando também um incremento no rendimento ao elevar a intensidade do campo magnético, assim como observado no atual estudo.

5.5.1 Teste de Tukey

Visando analisar se as diferenças observadas na síntese do éster emoliente foram estatisticamente significativas quando se empregou os diferentes valores de intensidade de campo magnético, foi realizado o teste de Tukey sobre a produtividade do bioprocessamento, para comparações múltiplas, por meio do software Statistica 12.5.

A variável produtividade foi selecionada para esta análise, devido sua importância na indústria, já que relaciona produto formado por tempo de reação, tendo valores mais elevados à medida em que o tempo de reação é reduzido, minimizando assim, os custos do processo com energia, manutenção e trabalho humano (OPPENHEIM, 2006).

A Tabela 5.10 mostra a produtividade obtida pela variação da intensidade do campo magnético. Foram utilizadas as letras **a e b** para diferenciar os resultados que tiveram diferença estatística. A Figura 5.22 mostra o gráfico da produtividade em função da intensidade do campo magnético e seus desvios padrões.

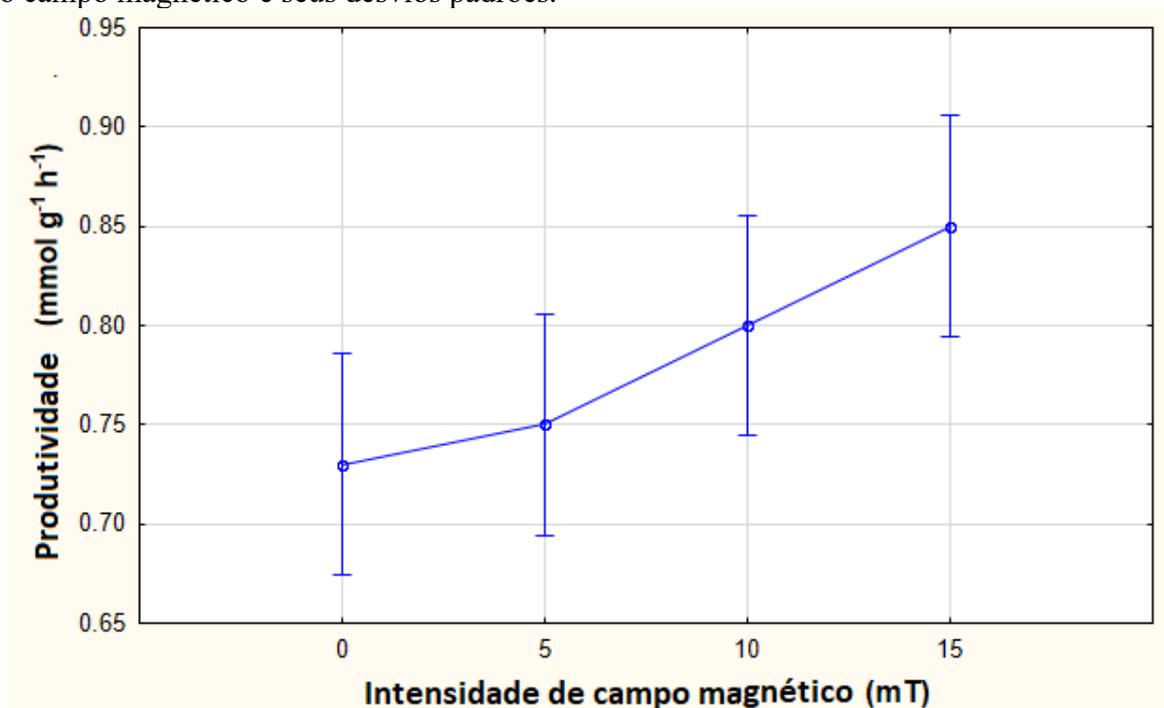
Tabela 5.10 – Influência da intensidade do campo magnético na produtividade do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR.

Intensidade do campo magnético (mT)	Produtividade (mmol g ⁻¹ h ⁻¹)*
0	0,750 ± 0,022 a
5	0,752 ± 0,020 a b
10	0,800 ± 0,022 a b
15	0,850 ± 0,023 b

* Médias que possuem a mesma letra não possuem diferença significativa, no intervalo de 95% de confiança.

Fonte: próprio autor.

Figura 5.22 – Produtividade do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR em função da intensidade do campo magnético e seus desvios padrões.



Fonte: próprio autor.

Analisando-se a Tabela 5.10 e a Figura 5.22 é possível observar que ocorre um aumento da produtividade em função do incremento na intensidade do campo magnético. No entanto, por meio do teste de Tukey, utilizando intervalo de confiança de 95%, notou-se que houve diferença estatística das produtividades apenas entre os experimentos que empregaram intensidade de campo magnético 0 e 15 mT.

Estes resultados demonstram que é necessário o emprego de 15 mT de intensidade de campo magnético para conseguir aumentar significativamente o grau de mistura do MFSBR nas condições analisadas. Destaca-se que não foram realizados testes empregando intensidade de campo magnético superior a 15 mT, devido à limitação da intensidade da corrente elétrica produzida pela fonte de alimentação utilizada (que estava no seu máximo 20 A).

Outra proposta de configuração para o MFSBR, visando aumentar o grau de mistura no interior do biorreator, e conseqüentemente seu rendimento e produtividade, foi enrolar o fio de cobre do solenoide diretamente no reator, sem a utilização do suporte, reduzindo assim, o diâmetro interno do solenoide. Esta configuração possibilitou a obtenção de um campo magnético de até 30 mT, no entanto, ocorreu um aumento considerável da temperatura no interior do biorreator, atingindo temperaturas acima de 100 °C em apenas 2 duas horas de

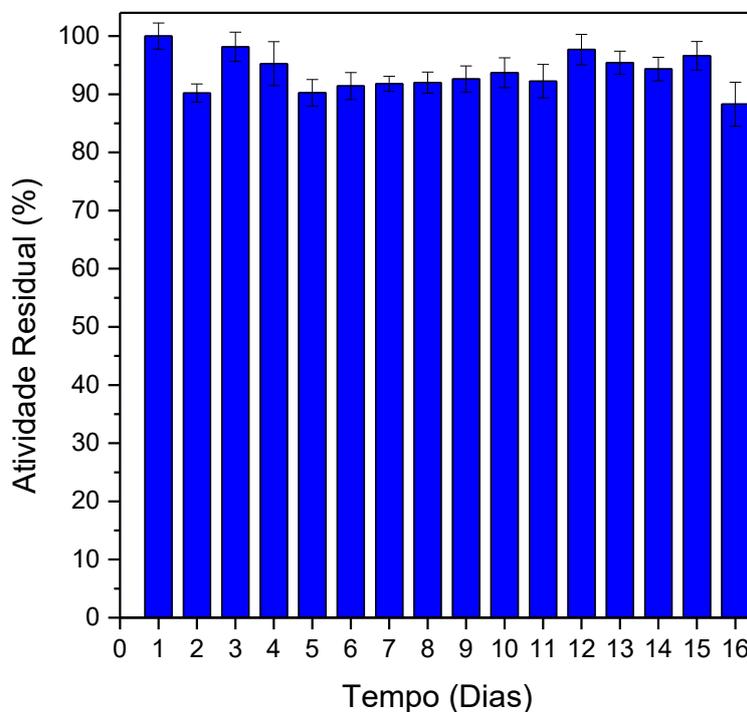
operação. Este fato impossibilitou a utilização desta configuração, já que a enzima sofre desnaturação quando exposta a temperaturas elevadas.

5.5.2 Estabilidade operacional do sistema experimental empregando biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR)

Foi realizado o teste da estabilidade operacional do biocatalisador a partir da síntese do éster emoliente conduzida no MSFBR nas condições que resultaram nos maiores valores de rendimento de esterificação, concentração e produtividade em éster (razão molar 1:1, tempo espacial de 12 horas e intensidade do campo magnético de 15 mT). O sistema experimental foi operado continuamente por 16 dias.

A Figura 5.23 mostra os resultados da atividade residual do biocatalisador obtidos no teste de estabilidade operacional na síntese do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR. Analisando esta figura, é possível observar que o sistema se mostrou bastante estável operacionalmente, apresentando uma perda de atividade de apenas 11,71 % após 16 dias de operação. O valor médio do rendimento de esterificação foi de 55,63%, concentração de 416,86 g L⁻¹ e produtividade em éster de 0,850 mmol g⁻¹ h⁻¹. Esses valores foram 15,32% superiores aos valores obtidos em biorreator de leito fluidizado isento de campo magnético.

Figura 5.23 – Estabilidade operacional do biocatalisador na síntese do oleato de 2-etil-hexila em MSFBR empregando 15 mT de intensidade de campo magnético.



Fonte: Próprio autor

O biocatalisador apresentou um tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de 2148 h (179 ciclos de operação) e constante de desativação (K_d) de $3,23 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9446$). Esses valores foram 25,23% superiores aos encontrados no biorreator de leito fluidizado sem a aplicação do campo magnético.

Baseado nesses resultados, é possível afirmar que a aplicação do campo magnético e a estabilização magnética do leito fluidizado, proporcionaram um melhor desempenho da síntese do oleato de 2-etil-hexila e incrementou a estabilidade operacional do biocatalisador, mostrando estabilidade do sistema experimental empregado, proporcionando benefícios consideráveis para o bioprocessamento.

5.6 Comparação entre os principais resultados obtidos

Para uma melhor visualização e comparação dos principais resultados obtidos neste trabalho, a Tabela 5.11 mostra a condição selecionada como mais adequada para cada tipo de biorreator empregado para a condução do bioprocessamento.

Tabela 5.11 – Condição selecionada para cada tipo de biorreator empregado.

Parâmetro	Biorreator de leito fixo	Biorreator de leito fluidizado	Biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente
Temperatura (°C)	50	50	50
Tempo espacial (h)	12	12	12
Razão Molar (ácido:álcool)	1:1	1:1	1:1
Volume do biorreator (mL)	15,8	35,7	35,7
Massa de biocatalisador (g)	4,3	3,5	3,5
Porosidade	0,660	0,892	0,892
Intensidade do campo magnético (mT)	-	-	15

Fonte: Próprio autor.

A Tabela 5.12 mostra os principais resultados de rendimento de esterificação, concentração e produtividade em éster para cada condição selecionada, além do tempo de meia-vida do biocatalisador empregado em cada tipo de biorreator.

Tabela 5.12 – Média do rendimento de esterificação, concentração em éster, produtividade em éster e tempo de meia-vida do biocatalisador na condição selecionada como ideal para cada tipo de biorreator.

Tipo de biorreator	Rendimento de esterificação (%)	Concentração em éster (g L⁻¹)	Produtividade (mmol g⁻¹ h⁻¹)	Tempo de meia-vida (dias)
Biorreator de leito fixo	60,72 ± 1,27	471,65 ± 10,98	0,278 ± 0,006	86
Biorreator de leito fluidizado	48,24 ± 1,90	383,09 ± 15,24	0,730 ± 0,031	71
Biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente	55,35 ± 1,41	440,63 ± 12,13	0,850 ± 0,023	89

Fonte: Próprio autor.

Analisando os dados da Tabela 5.12 foi possível observar que os biorreatores de leito fixo e fluidizado estabilizado magneticamente apresentaram resultados similares de rendimento de esterificação (60,72% e 55,35%, respectivamente) e de concentração em éster (471,67 e 440,63 g L⁻¹, respectivamente). Já o biorreator de leito fluidizado apresentou um

desempenho inferior aos demais, demonstrando respostas em média 20% inferior, com rendimento de esterificação de 48,24% e concentração em éster de 383,09 g L⁻¹.

A maior produtividade foi obtida quando empregou-se o MFSB (0,850 mmol g⁻¹ h⁻¹), sendo este valor cerca de 15% maior do que o obtido pelo biorreator de leito fluidizado (0,730 mmol g⁻¹ h⁻¹), e cerca de três vezes maior que o obtido pelo biorreator de leito fixo (0,278 mmol g⁻¹ h⁻¹).

Em relação ao tempo de meia-vida do biocatalisador, foi observado que o maior tempo de meia vida obtido foi para o biocatalisador empregado no MFSB (89 dias), este valor é 4% maior do que o obtido no biorreator de leito fixo (86 dias), e aproximadamente 20% maior em relação ao obtido no biorreator de leito fluidizado (71 dias).

Estes resultados demonstram o bom desempenho do MFSB na síntese do oleato de 2-etil-hexila, pois este bioprocessos obteve rendimento de esterificação e concentração em éster consideráveis, e o maiores valores de produtividade e tempo de meia-vida.

6 CONCLUSÕES

Considerando os resultados obtidos neste trabalho, é possível notar que o biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Candida antarctica* B em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado com magnetita apresentou bom desempenho na síntese contínua do oleato de 2-etil-hexila em todas as configurações de biorreatores testados. Destaque especial deve ser dado ao desenvolvimento de um sistema experimental utilizando um biorreator de leito fluidizado estabilizado magneticamente. Foi possível constatar as seguintes conclusões:

- As maiores concentrações e produtividades em éster foram obtidas nas razões molares mais próximas de 1:1 (ácido:álcool), devido a menor diluição dos produtos no meio reacional, favorecendo a síntese do éster.
- No biorreator de leito fixo o biocatalisador mostrou-se estável operacionalmente durante os 16 dias de reação, revelando um tempo de meia-vida do biocatalisador de 2063 h (86 dias) e constante de desativação igual a $3,36 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$.
- A porosidade e o tempo espacial no biorreator de leito fluidizado influenciaram diretamente no rendimento, concentração e produtividade do oleato de 2-etil-hexila. Ao elevar a porosidade do leito, houve um incremento no grau de mistura no seu interior, devido o aumento da velocidade intersticial.
- A condição experimental mais adequada para a síntese do éster emoliente no biorreator de leito fluidizado foi a que empregou 0,892 de porosidade e 12 horas de tempo espacial, visto que, apresentou elevada produtividade com rendimento satisfatório. O biocatalisador apresentou elevada estabilidade operacional, mantendo cerca de 85% de sua atividade inicial após 16 dias de operação, demonstrando um tempo de meia-vida de 1714 h.
- O aumento da intensidade do campo magnético no reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MFSB) incrementou o rendimento da reação e a produtividade em éster deste bioprocessos, sendo constatado pela análise estatística, que somente a condição

que empregou 15 mT apresentou diferença significativa em relação à condição que não empregou campo magnético (biorreator de leito fluidizado).

- O biocatalisador apresentou elevada estabilidade operacional no MFSB, demonstrando perda de apenas 11,71% da atividade inicial do biocatalisador após 16 dias de operação, revelando um tempo de meia-vida de 2148 h, com constante de desativação de $3,23 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$.

Em geral, pode-se concluir que o MFSB se apresenta como uma tecnologia promissora para o campo da biocatálise, visto que, os resultados deste trabalho demonstraram vantagens em se utilizar esta configuração de biorreator, expressando desempenho superior às demais configurações avaliadas para a síntese do éster emoliente oleato de 2-etil-hexila, obtendo rendimento de 55,35%, concentração em éster de $440,63 \text{ g L}^{-1}$ e produtividade de $0,850 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$, além de uma elevada estabilidade operacional do biocatalisador (aproximadamente 90 dias).

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A seguir são apresentadas algumas sugestões para trabalhos futuros:

- Desenvolvimento de novos suportes magnetizados para imobilização de enzimas que tenham magnetização de saturação superior ao apresentado pelo STY-DVB-M utilizado neste trabalho ($4,5 \text{ emu g}^{-1}$).
- Avaliação de outros métodos de imobilização de enzimas, visando elevar o desempenho do biocatalisador no MFSB.
- Avaliação de outras lipases relatadas na literatura como adequadas para sínteses, como a lipase de *Thermomyces lanuginosus*, lipase de *Penicillium camemberti*, lipase pancreática suína, Eversa[®] (lipase produzida por *Aspergillus oryzae*), entre outras.
- Desenvolvimento de um MFSB com capacidade para operar com intensidade de campo magnético superior ao utilizado neste trabalho (15 mT).
- Utilização de outros substratos para obtenção de diferentes produtos de interesse comercial no MFSB, avaliando-se a influência da polaridade das espécies químicas, densidade e viscosidade do substrato, higroscopicidade, etc.
- Avaliação técnico-econômica da utilização do MFSB, principalmente em relação à energia elétrica necessária para sua operação.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS. Panorama do setor 2023. Disponível em: https://abihpec.org.br/site2019/wp-content/uploads/2023/01/Panorama_do_-Setor-Atualizacao21-07-23.pdf. Acesso em: 13 ago. 2023.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52-67, 2015.
- AISIDA, S. O. *et al.* Bio-inspired encapsulation and functionalization of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Eur. Pol. J.**, v. 122, n. 109371, 2020.
- AL-QUODAH, Z. *et al.* Immobilized enzymes bioreactors utilizing a magnetic field: A review. **Biochem. Eng. J.**, v. 121, p. 94-106, 2017.
- ALLOUE, W. A. M. *et al.* Comparison of *Yarrowia lipolytica* lipase immobilization yield of entrapment, adsorption, and covalent bond techniques. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v. 150, p. 51-63, 2008.
- AMINI, Z. *et al.* State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energ. Convers. Manage.**, v. 141, p. 339-353, 2017.
- ANDUALEMA, B.; GESSESSE A. Microbial Lipases and Their Industrial Applications: Review. **Biotech.**, v. 11, p. 100-118, 2012.
- ARIAEENEJAD, S. *et al.* Application of carboxymethyl cellulose-g-poly(acrylic acid-co-acrylamide) hydrogel sponges for improvement of efficiency, reusability and thermal stability of a recombinant xylanase. **Chem. Eng. J.**, v. 375, n. 122022, 2019.
- BAREL, A. O.; PAYE, M.; MAIBACH, H. I. **Handbook of Cosmetic Science and Technology**, 4th ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. 725 p.
- BARRETO, A. C. H. *et al.* Novel ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluid. Nanofluid.**, v. 12, p. 677-686, 2012.
- BARSÉ, L. Q. *et al.* Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 34, p. 389-397, 2018.
- BASSI, J. J. *et al.* Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 92, p. 900-909, 2016.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes - A review. **Mol. Catal.**, v. 479, n. 110607, 2019.
- BENTO, H. B. S. *et al.* Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. **J. Magn. Magn. Mater.**, 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) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2015.
- BÔA MORTE, E. F. *et al.* Modified magnetite nanoparticle as biocatalytic support for magnetically stabilized fluidized bed reactors. **J. Mater. Res. Technol.**, v. 14, p. 1112-1125, 2021.
- BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; DE CASTRO, H. F. Comparative performance of microbial lipases immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol particles. **Braz. Arch. Biol. Techn.**, v. 51, n. 5, p. 889-896, 2008.
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and Enzyme Technology**, 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. 626 p.
- BUGG, T. D. H. **Introduction to enzyme coenzyme chemistry**, 3th ed. New York: Wiley, 2012. 290 p.
- CALLISTER, W. D.; RETHWISCH, D. G. **Fundamentals of materials science and engineering: an integrated approach**, 6th ed. New York: Wiley, 2021. 976 p.
- CAO, L. **Carrier-bound immobilized enzymes**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 563 p.
- CAPPANNELLA, E. *et al.* Immobilized lysozyme for the continuous lysis of lactic bacteria in wine: Bench-scale fluidized-bed reactor study. **Food Chem.**, v. 210, p. 49-55, 2016.
- CARRAHER JR., C. E. **Introduction to polymer chemistry**, 4th ed. Boca Raton: CRC PRESS, 2017. 588 p.
- CASTIGLIONI, G. L. *et al.* Application of Poly(styrene-co-divinylbenzene) macroporous microparticles as a catalyst in the enzymatic synthesis of biodiesel. **J. Polym. Environ.**, v. 24, p. 264-273, 2016.
- CHANG, S. W. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. **Process Biochem.**, v. 42, p. 1362-1366, 2007.
- CHAO, C. *et al.* Emollients for cosmetic formulations: Towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions. **Colloid Surface A**, v. 536, p. 156-164, 2018.
- CHEN, G. *et al.* Biodiesel production from waste cooking oil in a magnetically fluidized bed reactor using whole-cell biocatalysts. **Energ. Convers. Manage.**, v. 138, p. 556-564, 2017.
- CHEN, K.; ARNOLD, F. H. Engineering new catalytic activities in enzymes. **Nat. Catal.**, v. 3, n. 3, p. 203-213, 2020.
- CHIARADIA, V. *et al.* Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 131, p. 31-35, 2016.

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

CHRISTOPHER, L. P.; KUMAR, H.; ZAMBARE, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Appl. Energ.**, v. 119, p. 497-520, 2014.

CLARKE, K.G. **Bioprocess engineering: An introductory engineering and life science approach**. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2013. 266 p.

COEY, J. M. D. **Magnetism and magnetic materials**. Cambridge: Cambridge University Press, 2010. 625 p.

CUBIDES-ROMAN, D. C. *et al.* Ethyl esters (biodiesel) production by *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. **Fuel**, v. 196, p. 481-487, 2017.

CULLITY, B. D.; GHAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**, 2nd ed. Weinheim: WILEY, 2008. 568 p.

DAMNJANOVIĆ, J.J. *et al.* Covalently immobilized lipase catalyzing high-yielding optimized geranyl butyrate synthesis in a batch and fluidized bed reactor. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, v. 75, p. 50-59, 2012.

DAMSTRUP, M. L. *et al.* Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7786-7792 2007.

DANESHFAR, A. *et al.* Synthesis of 2-ethylhexyl-2-ethylhexanoate catalyzed by immobilized lipase in *n*-hexane: A kinetic study. **Biochem. Eng. J.**, v. 37, p. 279-284, 2007.

DELUZEL, H.; SCHULTZE, X.; SHERRINGTON, D. C. C. Porosity analysis of some poly(styrene/divinylbenzene) beads by nitrogen sorption and mercury intrusion porosimetry. **Polym. Bull.**, v. 44, p. 179-186, 2000.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochem. Eng. J.**, v. 44, p. 220-225, 2009.

DOS SANTOS, P.; MEIRELES, M. A. A.; MARTÍNES, J. Immobilization of CALB on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. **Biotechnol. Rep.**, v. 14, p. 16-26, 2017.

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

DWEVEDI, A. **Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. Basel: Springer, 2016. 132 p.

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

FARIAS, C. B. B. *et al.* Production of green surfactants: Market prospects. **Electron. J. Biotechnol.**, v. 51, p. 28-39, 2021.

FENG, X. *et al.* The spinning cloth disc reactor for immobilized enzymes: A new process intensification technology for enzymatic reactions. **Chem. Eng. J.**, v. 221, p. 407-417, 2013.

FIDALGO, W. R. R. *et al.* A fluidized bed reactor as an approach to enzymatic biodiesel production in a process with simultaneous glycerol removal. **J. Ind. Eng. Chem.**, v. 38, p. 217-223, 2016.

FOGLER, H. **Elements of Chemical Reaction Engineering**, 6th ed. London: Pearson, 2020. 1088 p.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, p. 769–777, 2007.

FREITAS, L. *et al.* Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor. **Eur. Food Res. Technol.**, v. 233, p. 743-750, 2011.

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

GALAN-GARCIA, C. *et al.* Evaluation of Styrene-Divinylbenzene Beads as a Support to Immobilize Lipases. **Molecules**, v. 19, p. 7629-7645, 2014.

GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR J. Synthesis of Macroporous Poly (styrene-co-divinylbenzene) Microparticles Using n-Heptane as the Porogen: Quantitative Effects of the DVB Concentration and the Monomeric Fraction on Their Structural Characteristics. **Ind. Eng. Chem. Res.**, n. 44, p. 8237-8247, 2005.

GHANDI, N. N. *et al.* Lipase-catalyzed esterification. **Cataly. Rev.**, v. 42, p. 439-480, 2000.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**, 4th ed. Totowa: Humana Press, 2020. 495 p.

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

HE, X.; CHEN, B.; TAN, T. Enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl esters of fatty acids by immobilized lipase from *Candida sp.* 99–125. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 18, p. 333-339, 2002.

HOLLIS, G. L. **Surfactants Europa: A Directory of Surface Active Agents Available in Europe**, 3th ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2007. 478 p.

ILLANES, A. **Enzyme biocatalysis: principles and application**. Dordrecht: Springer Science Business Media B.V, 2008. 392 p.

IWATA H., SHIMADA K. **Formulas, Ingredients and Production of Cosmetics: Technology of Skin- and Hair-Care Products in Japan**. Tokyo: Springer, 2013. 224 p.

JAHANZAD, F.; SAJJADI, S.; BROOKS, B. W. Characteristic intervals in suspension polymerization reactors: An experimental and modelling study. **Chem. Eng. Sci.**, v. 60, p. 5574-5589, 2005.

JAISWAL, K. S.; RATHOD, V. K. Enzymatic synthesis of cosmetic grade wax ester in solvent free system: optimization, kinetic and thermodynamic studies. **SN Appl. Sci.**, v. 1; p. 949-959, 2019.

JILES, D. **Introduction to magnetism and magnetic materials**, 3th ed. Boca Raton: CRC PRESS, 2015. 635 p.

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

KIM, H. *et al.* Synthesis of diethylhexyl adipate by *Candida antarctica* lipase-catalyzed esterification. **Process Biochem.**, v. 78, p. 58-62, 2019.

KIRK-OTHMER, R. E. **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, 5th ed. New-York: Wiley-Interscience, v. 9, 2004. 864 p.

KOHLPAINTNER, C. *et al.* Aldehydes, Aliphatic and Aromatic. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 7th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. v. 2, p. 285 – 316.

KOLTZENBURG, S.; MASKOS, M.; NUYKEN. **Polymer Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2017. 584 p.

KOVALENKO G. A.; PERMINOVA, L. V.; BEKLEMISHEV, A. B. Catalytic properties of recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized by impregnation into mesoporous silica in the enzymatic esterification of saturated fatty acids with aliphatic alcohols. **React Kinet. Mech. Catal.**, v. 128, p. 479-491, 2019.

LACAZE-DEFURE, C.; MOULOUGUI, Z. Catalysed or uncatalysed esterification reaction of oleic acid with 2-ethyl hexanol. **Applied Catal. A-Gen.**, v. 204, p. 223-227, 2000.

LACZKOWSKI, I. M. **Efeito magneto-óptico em mistura binária dopada com ferrofluido**. 2010. 116p. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de Maringá, UEM, Maringá. 2010.

LAGE, F. A. P. *et al.* 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 Microb. Technol.**, v. 84, p. 56 - 67, 2016.

LANZENDORFER, G. **Lipids in skin care formulations, in Cosmetic Lipids and the Skin Barrier**, New York: Marcel Dekker, Cosmetic Science and Technology series, Archives of Dermatology research, v. 24, p. 267–271, 2002.

LERIN, L. *et al.* Successive cycles of utilization of novozym 435 in three different reaction systems. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 28, n. 2, p. 181-188, 2011.

LI, J. *et al.* Magnetic field acceleration of CO₂ reforming of methane over novel hierarchical Co/MgO catalyst in fluidized bed reactor. **Chem. Eng. J.**, v. 350, p. 496-506, 2018.

LIMA, W. A. **Síntese e caracterização de compósitos polianilina/poli(estireno-co-divinilbenzeno) para Adsorção de Ânions [SnCl₄]⁻²**. 2013. 120p. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – IQ/UFG, Goiânia. 2013.

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. **Mol. Catal.**, v. 466, p. 7-105, 2019.

LIU, Y.; SELLMYER, D. J.; SHINDO, D. **Handbook of advanced magnetics materials**. New York: Springer, 2006. v. 1, 377 p.

LOKKO, Y., Biotechnology and the bioeconomy—Towards inclusive and sustainable industrial development. **New Biotechnol.**, v. 40, p. 5-10, 2018.

LONG, N. V. D. *et al.* Novel hybrid-blower-and-evaporator-assisted distillation for separation and purification in biorefineries. **Chem. Eng. Process**, v. 123, p. 195-203, 2018.

MARTÍNEZ, S. A. H. *et al.* Magnetic nanomaterials assisted nanobiocatalysis systems and their applications in biofuels production. **Fuel**, v. 312, n. 122927, 2022

MARTINS, A. B. *et al.* Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. **Bioresource Technol.**, v. 133, p. 417-422, 2013.

MATTE, C. R. *et al.* Synthesis of butyl butyrate in batch and continuous enzymatic reactors using *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized in Immobead 150. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 127, p. 67-75, 2016.

MCGINTY, D. *et al.* Fragrance material review on 2-ethyl-1-hexanol. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 115-129, 2010.

MEHRASBI, M. R. *et al.* Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil. **Renew. Energ.**, v. 101, p. 593-602, 2017.

MENG, X. *et al.* Improvements of lipase performance in high-viscosity system by immobilisation onto a novel kind of poly(methylmethacrylate-co-divinylbenzene) encapsulated porous magnetic microsphere carrier. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 89, p. 86-92, 2013.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipases A and B from *Candida antarctica* immobilized onto magnetic nanoparticles. Improvement of biocatalysts' performance under ultrasonic irradiation. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 5807, 2019.

MONTIEL, M. C. *et al.* Synthesis of cetyl ricinoleate catalyzed by immobilized Lipozyme[®] CalB lipase in a solvent-free system. **Catal. Today**, v. 255, p. 49-53, 2015.

MOREIRA, T. S. DE SOUZA, V. P.; PIERRE, M. B. A novel transdermal delivery system for the anti-inflammatory lumiracoxib: influence of oleic acid on in vitro percutaneous absorption and in vivo potential cutaneous irritation. **PDA J. Pharm. Sci. Tech.**, v. 11, p. 621-629, 2010.

NAGUIB, H. M.; ZHANG, X. H. Advanced recycled polyester based on PET and oleic acid. **Polym. Test.**, v. 69, p. 450-455, 2018.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 7th ed. Porto Alegre: Artmed, 2018. 1312 p.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 85-86, p. 71-92, 2013.

NOWECK, K.; GRAFAHREND, W. Fatty Alcohols. In: **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, 7th ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2011. v. 14, p. 117-141.

OLIVEIRA, A. F. *et al.* In vitro use of free fatty acids bound to albumin: A comparison of protocols. **Biotechniques**, v. 58, p. 228-233, 2015.

OPPENHEIM, B. W. Impact of productivity on energy conservation. **Strateg. Plan. Energ. Environ.**, v. 26, n. 3, p. 48-65, 2006.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introduction to spectroscopy**, 5th ed. Stamford: Cengage Learning, 2015. 784 p.

PEREIRA JR, N. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008. 63p.

PESSÔA, M.G. *et al.* Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology. **Biotechnol. Adv.**, v. 37, p. 319-339, 2019.

PINTO, M. C.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C. Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*. **Molecules**, v. 19, p. 12509-12530, 2014.

PIRES-CABRAL, P.; DA FONSECA, M. M. R.; FERREIRA-DIAS, S. Esterification activity and operational stability of *Candida rugosa* lipase immobilized in polyurethane foams in the production of ethyl butyrate. **Biochem. Eng. J.**, v. 48, p. 246-252, 2010.

POPPE, J. K. *et al.* Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnol. Adv.**, v. 33, p. 511-525, 2015.

- QI, H.; DU, Y.; HU G.; ZHANG, L. Poly(carboxybetaine methacrylate)-functionalized magnetic composite particles: A biofriendly support for lipase immobilization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 107, p. 2660-2666, 2018.
- RANGEL, A. B. S. *et al.* 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. **Catal. Letters**, v. 153, p. 1-13, 2022.
- RAUT, R. K.; SHAIKH, M.; DARBHA, S. Synthesis of fatty monoester lubricant base oil catalyzed by Fe-Zn double-metal cyanide complex. **J. Chem. Sci.**, v. 126, p. 997-1003, 2014.
- REMONATTO, D. *et al.* Solvent-Free Enzymatic Synthesis of Dietary Triacylglycerols from Cottonseed Oil in a Fluidized Bed Reactor. **Molecules**, v. 28, n. 14, p. 5384, 2023.
- RICHARDSON, J. F.; ZAKI, W. N. Sedimentation and fluidisation. Part 1. **Trans. Inst. Chem. Eng.**, v. 32, p. 35-53, 1954.
- RODRIGUES, D. S. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase type B by adsorption on activated carbon. **Chem. Biochem. Eng. Q.**, v. 22, p. 125-133, 2008a.
- RODRIGUES, D S. *et al.* Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **J. Mol. Catal., B Enzym.**, v. 51, p. 100–109. 2008b.
- RODRIGUEZ, F. *et al.* **Principles of Polymer Systems**, 6th ed. Boca Raton: CRC Press, 2014. 810 p.
- 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) - Universidade de São Paulo, Escola de Engenharia de Lorena, Lorena, 2019.
- SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, 2nd ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. 416 p.
- SALIHU, A; ALAM, M. Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochem.**, v. 50, p. 86-96, 2015.
- SANDOVAL, G. **Lipases and phospholipases: methods and protocols**, 2nd ed. New York: Humana Press, 2018. 437 p.
- SANTOS, J. C. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of butyl esters by direct esterification in solvent-free system. **J. Chem. Technol. Biot.**, v. 82, p. 956-961, 2007.
- SCHMIDELL, W. *et al.* **Biotecnologia Industrial**. 2nd ed. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA., 2021. v. 2. 748 p.
- SCHUELLER R.; ROMANOWSKI P. **Conditioning Agents for Hair and Skin**, New York: Marcel Dekker, 1999. 398 p.

SERWAY, R. A.; JEWETT JR., J. W. **Physics for scientists and engineers with modern physics**, 10th ed. Boston: Brooks/Cole, 2018. 1484 p.

SHEN, H. *et al.* Synthesis of 2-ethyl hexanol fatty acid esters in a packed bed bioreactor using a lipase immobilized on a textile membrane. **Biocatal. Biotransformation**, v. 33, p. 44-50, 2015.

SHU, C. *et al.* Biocatalytic production of ethyl butyrate from butyric acid with immobilized *Candida rugosa* lipase on cotton cloth. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 72, p. 139-144, 2011.

SILVA, M.V.C. *et al.* Isopropyl myristate continuous synthesis in a packed-bed reactor using lipase immobilized on magnetic polymer matrix. **Int. J. Eng. Res. Sci.**, v. 4, p. 12-20, 2018a.

SILVA, M.V.C. *et al.* Optimization of the parameters that affect the synthesis of magnetic copolymer styrene-divinylbenzene to be used as efficient matrix for immobilizing lipases. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 34, p. 169-181, 2018b.

SILVA, M. V. C. *et al.* Continuous enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl oleate in a fluidized bed reactor: operating conditions, hydrodynamics, and mathematical modeling. **Ind. Eng. Chem. Res.**, v. 59, n. 44, p. 19522-19530, 2020a.

SILVA, M. V. C. *et al.* Synthesis of 2-ethylhexyl oleate catalyzed by *Candida antarctica* lipase immobilized on a magnetic polymer support in continuous flow. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 43, p. 615-623, 2020b.

SILVA, M. V. C. *et al.* Development of a magnetically stabilized fluidized bed bioreactor for enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl oleate. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 46, p. 1665-1676, 2023.

SINGH, S. P. *et al.* **Biomass, biofuels, biochemicals: Advances in enzyme catalysis and technologies**. Philadelphia: Elsevier Science Publishing, 2020. 472p.

SRIAKKARIN, C. *et al.* Sustainable production of methanol from CO₂ over 10Cu-10Fe/ZSM-5 catalyst in a magnetic field-assisted packed bed reactor. **Catal. Today**, v. 314, p. 114-121, 2018.

STEDMAN, T. L. **Medical dictionary**, 28th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 2013. 2162 p.

STEFANITA, C. G. **Magnetism: basics and applications**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012. 336 p.

STERGIOU, P. Y. *et al.* Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotech. Advances**, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

TANASKOVIĆ, S. J. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Appl. Clay Sci.**, v. 135, p. 103-111, 2017.

TANG, W. *et al.* Polyamine-induced tannic acid co-deposition on magnetic nanoparticles for enzyme immobilization and efficient biodiesel production catalysed by an immobilized

enzyme under an alternating magnetic field. **Catal. Sci. Technol.**, v. 9, n. 21, p. 6015–6026, 2019.

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.

TREYBAL, R. E. **Mass-Transfer operations**. New York: McGraw-Hill, 1980. 784 p.

TRIVEDI, J. *et al.* Clean synthesis of biolubricant range esters using novel liquid lipase enzyme in solvent free médium. **Springerplus**, v. 4, p. 1-9, 2015.

UPPENBERG, J. *et al.* 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. *et al.* 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. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, p. 407-412, 2008.

VADGMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I: batch optimization studies. **Biotechnol. Rep.**, v. 8, p. 133-137, 2015a.

VADGAMA, R.N.; ODANETH, A.A.; LALI, A.M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part II: Packed bed reactor (PBR) studies. **Biotechnol. Rep.**, v. 8, p. 105-109, 2015b.

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

VILAS BÔAS, R. N.; BIAGGIO, F. C.; GIORDANI, D. S.; DE CASTRO, H. F. Síntese enzimática do caprilato de isopentila utilizando óleo fusel como matéria-prima. **Quim. 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 Bioenerg.**, v. 119, p. 61-68, 2018.

WU S., *et al.* Biocatalysis: Enzymatic synthesis for industrial applications. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 60, n. 1, p. 88–119, 2021

WYPYCH, A. **Databook of plasticizers**, 2nd ed. Toronto: ChemTec Publishing, 2017. 710 p.

YILMAZ, F. **Polymer Science**. Rijeka: InTech, 2013. 258 p.

YOO, Y. J.; FENG, Y.; KIM, Y. H.; YAGONIA, C. F. **Fundamentals of enzyme engineering**. Dordrecht: Springer Science Business Media B.V., 2017. 209 p.

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. Cap.4. p. 41-84.

ZHAO, X. *et al.* Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renew. Sust. Energ. Rer.**, v. 44, p. 182-197, 2015.

ZHAO, F.; ZHANG, B.; FENG, L. Preparation and magnetic properties of magnetic nanoparticles. **Mater. Lett.**, v. 68, p. 112-114, 2012.

ZHENG, M. *et al.* Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic poly(allyl glycidyl ether-co-ethylene glycol dimethacrylate) polymer microsphere for synthesis of phytosterol esters of unsaturated fatty acids. **J. Mol. Catal. B-Enzym.**, v. 74, p. 16-23, 2012.

ZHOU, G.; CHEN, G.; YAN, B. Biodiesel production in a magnetically-stabilized, fluidized bed reactor with an immobilized lipase in magnetic chitosan microspheres. **Biotechnol. Lett.**, v. 36, p. 63-68, 2014.

APÊNDICE A

Principais artigos científicos publicados obtidos por meio do desenvolvimento do presente trabalho.

Título	Resumo	DOI
Synthesis of 2-ethylhexyl oleate catalyzed by <i>Candida antarctica</i> lipase immobilized on a magnetic polymer support in continuous flow	Foi estudada a síntese de oleato de 2-etil-hexila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> em partículas magnéticas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) em um biorreator de leito fixo operado de modo contínuo. O desempenho do reator foi avaliado quanto a razão molar (ácido:álcool) em cinco proporções molares (1:4 - 4:1). O desempenho do sistema foi analisado quanto ao tempo especial de 6, 12 e 18 horas. O melhor desempenho alcançado para o substrato na relação equimolar em 12 horas. O biocatalisador apresentou alta estabilidade operacional, com tempo meia-vida de 2.063 horas. Um modelo baseado no mecanismo ping-pong Bi-Bi foi desenvolvido para descrever a cinética da reação, com qualidade de ajuste satisfatória ($R^2 = 0,9310-0,9952$).	10.1007/s00449-019-02257-9
Continuous Enzymatic Synthesis of 2-Ethylhexyl Oleate in a Fluidized Bed Reactor: Operating Conditions, Hydrodynamics, and Mathematical Modeling	Foi realizada a síntese contínua de oleato 2-etil-hexila conduzida utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em partículas magnéticas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) em um reator de leito fluidizado (FBR) operado em modo contínuo. Os resultados mostraram alta produtividade em éster e rendimento de esterificação satisfatório em 12 horas de tempo espacial e porosidade de 0,892. Foi observado que quanto maior a porosidade, maior é o coeficiente de transferência de massa e a produtividade do reator. Foi proposto um modelo matemático baseado no mecanismo ping-pong Bi-Bi. Foi observada boa correlação entre os resultados experimentais e o modelo. O bioprocesso demonstrou elevada estabilidade operacional (tempo de meia-vida de 1.716 horas), tornando-se um bioprocesso promissor para aplicações industriais.	10.1021/acs.iecr.0c03504
Development of a magnetically stabilized fluidized bed bioreactor for enzymatic synthesis of 2-ethylhexyl oleate	Este estudo investigou a síntese de oleato de 2-etil-hexila utilizando lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em partículas magnéticas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) em um reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado (MFSB) operado em modo contínuo. A maior produtividade foi alcançada com intensidade de campo magnético de 15 mT. O Tempo de meia-vida do biocatalisador foi de 2.148 horas. Foi realizada modelagem matemática, demonstrando que o aumento da intensidade do campo magnético é capaz de aumentar o grau de Mistura e transferência de massa do sistema reacional. O MFSB pode aprimorar os processos biocatalíticos e representar uma estratégia promissora para a síntese enzimática do oleato de 2-etilhexila.	10.1007/s00449-023-02928-8

Fonte: Próprio autor.