

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

RONALDO PIO RODRIGUES DE SOUSA

**OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE CADEIA CURTA, MÉDIA E LONGA COM LIPASES
IMOBILIZADAS EM REAÇÕES MULTICOMPETITIVAS: estudo preliminar de
viabilidade técnico-econômica**

RIO DE JANEIRO

2025

RONALDO PIO RODRIGUES DE SOUSA

OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE CADEIA CURTA, MÉDIA E LONGA COM LIPASES IMOBILIZADAS EM REAÇÕES MULTICOMPETITIVAS: estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em Ciências

Orientadoras: Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro

2025

CIP - Catalogação na Publicação

S724o Sousa, Ronaldo Rodrigues de
 OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE CADEIA CURTA, MÉDIA E LONGA
 COM LIPASES IMOBILIZADAS EM REAÇÕES
 MULTICOMPETITIVAS: estudo preliminar de viabilidade
 técnico-econômica / Ronaldo Rodrigues de Sousa. --
 Rio de Janeiro, 2025.
 198 f.

 Orientadora: Viridiana Santana Ferreira-Leitão.
 Coorientadora: Denise Maria Guimarães Freire.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
 de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós
 Graduação em Bioquímica, 2025.

 1. biocatálise. 2. lipases. 3. ésteres. I.
 Ferreira-Leitão, Viridiana Santana, orient. II.
 Freire, Denise Maria Guimarães, coorient. III.
 Título.

Ronaldo Pio Rodrigues de Sousa

OBTENÇÃO DE ÉSTERES DE CADEIA CURTA, MÉDIA E LONGA COM LIPASES
IMOBILIZADAS EM REAÇÕES MULTICOMPETITIVAS: estudo preliminar de
viabilidade técnico-econômica

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em
Bioquímica, Instituto de Química da Universidade Federal do
Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção
do título de doutor em Ciências (Bioquímica)

Aprovada por:

Viridiana Santana Ferreira-Leitão, D.Sc. (Orientadora – Presidente)

Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc (Orientadora)

Adriano Aguiar Mendes, D.Sc.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral, D.Sc.

Rafael Costa Rodrigues, D.Sc.

Cristiane Dinis Ano Bom, D.Sc.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Uno e Trino (Pai, Filho e Espírito), o Criador e o Redentor de todas as coisas; à Ss. Virgem Maria pela intercessão, proteção, amparo e mediação de todas as graças que necessitei para concluir este trabalho.

À minha esposa Fernanda Pio Rodrigues e à minha primeira filha, Catarina. De amor e generosidade vocês enchem meu coração. Agradeço a paciência e compreensão pelas ausências, saídas apressadas e pelas preocupações decorrentes deste trabalho que carreguei para meu convívio com vocês. Dedico este trabalho, e os frutos que virão dele, à vocês, meus tesouros.

Aos meus pais Ana Maria e Manoel, primeiros e maiores professores. Aprendi a ler e escrever com eles, mas muito mais do que isso, aprendi com eles tudo sobre uma vida digna neste mundo.

Às minhas orientadoras, nobres e talentosas pesquisadoras, Dra. Viridiana Santana Ferreira-Leitão e Dra. Denise Maria Guimarães Freire. Além da gratidão por todo apoio e ensinamentos durante a execução deste trabalho, deixo aqui registrado minha admiração e apreço por poder trabalhar ao lado de vocês em prol do desenvolvimento tecnológico e científico em nossas instituições. À chefia da Divisão de Catálise, Biocatálise e Processos Químicos do INT, Dra. Clarissa Perdomo, e a chefia do Laboratório de Biocatálise, Bioprocessos e Bioprodutos do INT, Dra. Ayla Sant’Ana, a quem agradeço o apoio.

Ao INT, seu corpo técnico e administrativo, que direta ou indiretamente favoreceu a conclusão deste trabalho.

Ao MCTI, CAPES, CNPQ, FINEP e FAPERJ, pelo apoio direto e indireto na manutenção da infraestrutura para pesquisa

Ao PPGBQ/IQ/UFRJ, seus professores e servidores técnico-administrativos, que com seus esforços mantém este programa como um dos melhores do Brasil em sua área.

À Central Analítica da Faculdade de Farmácia (FF/CCS/UFRJ), em especial pela Dra. Aline Soares, pelas análises de espectrometria de massas.

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise, Bioprocessos e Bioprodutos do INT –Nadinne Medeiros, Ingrid Miguez, Marina Tomasini, Daniel Fasheun, Caroline Ribeiro, Carolina Reis, Álvaro Monteiro, Willian Monteiro, Davi Marcondes, Stella Buback, Mariana Faber, Roberta Espinheira, Mayla Brand, Gabriel Santos, Gabriel Haguihara, dentre outros com quem convivi de 2017 a 2025. Colegas que propiciaram um agradável ambiente de trabalho e que

enobrecem a instituição com sua dedicação, seu esforço e seu talento. Agradeço pelo apoio no dia-a-dia, pelos momentos de descontração e saudável convívio.

Aos alunos de iniciação científica que co-orientei desde 2017 na linha de pesquisa de síntese enzimática de especialidades químicas – Diane Frauches, Laís Picanço, Mayara Almeida, Raíssa Valviessse e Luany Coelho e, de forma mais especial à Matheus William Medeiros e Isabelle Barbosa, que trabalharam mais especificamente neste projeto e deram contribuição decisiva à este. Quando os conheci e trabalhamos juntos, eram profissionais em formação; hoje são profissionais de fato. Colegas que muito me auxiliaram nos trabalhos práticos em laboratório e com os quais muito aprendi ao tentar transmitir algum conhecimento. Agradeço pela boa convivência com todos vocês. Muito me alegro em ver o sucesso de suas trajetórias profissionais e acadêmicas.

Aos autores e co-autores dos artigos citados nesta tese, que pavimentaram o caminho do conhecimento que permitiu esta tese, particularmente àqueles e àquelas com que tive o privilégio de manter contato direto ou conhecer pessoalmente, como o Dr. John M. Woodley, Dr. Roberto Fernandez-Lafuente, Dra. Érika Aguiéiras, Dra. Evelin Andrade Manoel, Dra. Eliane Pereira Cipolatti, Dra. Heizir F. Castro, Dr. Adriano Mendes, Dra. Débora Oliveira, Dr. Rafael Rodrigues.

Conhece-te, aceita-te, supera-te.

Sto. Agostinho (séclo V)

RESUMO

SOUSA, Ronaldo Rodrigues de. **Obtenção de ésteres de cadeia curta, média e longa com lipases imobilizadas em reações multicompetitivas: estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica**. Rio de Janeiro, 2025. Tese (Doutorado em Bioquímica). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2025.

A biocatálise pode ser uma alternativa vantajosa para a obtenção de ésteres de interesse industrial. Contudo, a adoção da biocatálise esbarra tanto em desafios tanto econômicos (custo elevado) quanto tecnológicos no caso específico de síntese de ésteres de menor tamanho de cadeia, nos quais as elevadas concentrações de ácidos e álcoois de cadeia curta podem gerar inibição ou inativação do biocatalisador. Para viabilizar tecnicamente a síntese de ésteres de cadeia curta por biocatálise, este projeto propôs a síntese de ésteres de cadeia curta, média e longa simultaneamente na mesma reação (sistema multicompetitivo) sem a utilização de solventes. As lipases são específicas em relação ao tipo de reação e estão aptas a catalisar esterificações com substratos de diferentes tamanhos de cadeia. Um sistema multicompetitivo de reação contendo os ácidos acético (C2), cáprico (C10) e oléico (C18) reagindo simultaneamente com etanol (C2) e *n*-octanol (C8) para obtenção de ésteres etílicos e octílicos foi testado em sínteses catalisadas pelos seguintes biocatalisadores comerciais: Novozym 435 (lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica), Lipozyme RM IM (lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica) e Lipozyme TL IM (lipase de *Thermomyces lanuginosus* imobilizada em sílica). Na reação em sistema multicompetitivo catalisada por Novozym 435 em frasco agitado à 50 °C e condição equimolar foi atingido 88,8% de conversão em 4 h de reação. Este resultado foi superior ao observado nas mesmas condições nas sínteses individuais dos ésteres de cadeia mais curta estudados (acetato de etila e acetato de octila). Isto demonstrou que os mesmos efeitos causados pelo solvente (redução da concentração elevada de inibidores, da acidez e da hidrofobicidade do meio) na síntese podem ser obtidos por meio de uma mistura com reagentes de maior hidrofobicidade. Cálculos de produtividade volumétrica e produtividade catalítica indicaram que as reações em sistema multicompetitivo apresentaram métricas iguais ou superiores às sínteses individuais (com 1 ácido e 1 álcool) estudadas. Na busca por condições mais favoráveis ao processo, um protótipo de reator de coluna de bolhas foi desenvolvido visando aumentar a conversão, reduzir o tempo de reação e aumentar o reuso do biocatalisador. Com o protótipo, chegou-se a um resultado de 95,3% de conversão em 3 h de reação na condição de razão molar

ácidos:álcoois 1:2, com carga de biocatalisador 1,3% (m/m total). Na condição de razão molar 1:1,3 atingiu-se conversões próximas à 90% em apenas 2 h de reação, e a possibilidade de reusar o biocatalisador por 13 ciclos sequenciais, levando à uma produtividade catalítica elevada (878,8 kg de produto por kg de biocatalisador). Esta condição reacional foi modelada e simulada no software SuperPro Designer v.13, para estudo preliminar da viabilidade técnico-econômica das reações em sistema multicompetitivo. A simulação em um cenário de produção de 6000 ton ano⁻¹ de ésteres, separadamente para comercialização, indicaram um CAPEX de USD 30,5 milhões para instalação da planta e um OPEX anual de USD 37,5 milhões para operação, obtendo um valor presente líquido positivo de USD 90,5 milhões ao longo de 15 anos de projeto e um tempo de retorno de investimento de 1,8 anos, dentro do que é considerado economicamente viável para a indústria química. Considerando a produtividade volumétrica e a produtividade catalítica do processo neste cenário, o custo do biocatalisador (Novozym 435) correspondeu à apenas 13,2% dos custos operacionais anuais. A obtenção biocatalítica dos ésteres etílicos e octílicos em sistema multicompetitivo mostrou-se mais vantajosa do que sua obtenção por reações individuais entre um único ácido e um único álcool catalisadas por lipase imobilizada, apontando para uma tecnologia economicamente viável e sustentável que pode ser adotada para obtenção de outros ésteres.

Palavras-chave: biocatálise, lipases, ésteres.

ABSTRACT

SOUSA, Ronaldo Rodrigues de. **Short, mid, and long-chain esters obtaining process using immobilized lipases in multicompetitive systems: preliminary techno-economic assessment.** Rio de Janeiro, 2025. Thesis (Doctoral degree in Biochemistry). Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2025.

Biocatalysis can be an advantageous alternative for obtaining industrially relevant esters. However, the adoption of biocatalysis for this application faces both economic (high cost) and technological challenges in the synthesis of short-chain esters – high concentrations of short-chain acids and alcohols can generate inhibition or inactivation of the biocatalyst. To achieve feasibility in the biocatalytic synthesis of short-chain esters, this project proposed the synthesis of short-, medium- and long-chain esters simultaneously in the same medium (multicompetitive system) without the need for solvents. Lipases are specific to the type of reaction and can catalyze esterifications with substrates of different chain sizes. A multicompetitive reaction system containing acetic (C2), capric (C10) and oleic (C18) acids reacting simultaneously with ethanol (C2) and *n*-octanol (C8) to obtain ethyl and octyl esters was evaluated in syntheses catalyzed by commercial biocatalysts: Novozym 435 (*Candida antarctica* lipase B immobilized onto acrylic resin), Lipozyme RM IM (*Rhizomucor miehei* lipase immobilized onto anionic resin), and Lipozyme TL IM (*Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized onto silica). The multicompetitive reaction system catalyzed by Novozym 435 at 50 °C and equimolar conditions achieved 88.8% conversion of acids to esters after 4 h in a shaken flask. This result is higher than the obtained in the individual syntheses (1 acid and 1 alcohol) of the shorter chain esters studied (ethyl acetate and octyl acetate) in the same reaction conditions. This demonstrates that the mixture of short-chain reagents with of long and hydrophobic ones promotes the same effects of solvents in the synthesis – reduction of the high concentration of inhibitors, acidity and overall hydrophilicity of the medium. Volumetric productivity and catalytic productivity calculations indicated that the multicompetitive system reaction shows process metrics equal to or higher than the individual syntheses studied. Process improvement included the design and study of a prototype bubble column reactor, aiming to increase conversion, reduce reaction time and increase the biocatalyst reuse. A result of 95,3% conversion was achieved in 3 h of reaction in the bubble-column reactor prototype, adopting acids:alcohols molar ratio 1:2, biocatalyst loading 1.3%

(w/w total substrates). Conversions close to 90% were achieved using acids:alcohols molar ratio 1:1.3 in only 2 h; in this condition, the same biocatalyst loading can be reused 13 times, resulting in a high catalytic productivity (878,8 kg of product per kg of biocatalyst). The obtained data was used as input for process design and simulation using SuperPro Designer v.13 software, for preliminary technical-economic study. The base-case was a 6000 tons year⁻¹ esters production plant, isolatedly for commercialization. The simulation output indicated a CAPEX of USD 30,5 million for installation of the plant and an annual OPEX of USD 37,5 million for operation, obtaining a positive net present value of USD 90,5 million over 15 years project lifespan and a payback time of 1.8 years, which is considered economically feasible for the chemical industry. Considering the volumetric productivity and catalytic productivity of the process in this scenario, the cost of the biocatalyst (Novozym 435) corresponded to only 13,2% of the annual operating costs. The biocatalytic production of ethyl and octyl esters in a multicompetitive system is more advantageous than their production by individual reactions between a single acid and a single alcohol catalyzed by immobilized lipase, indicating an economically viable and sustainable technology that can be used to obtain other esters.

Keywords: biocatalysis, lipases, esters

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|------------|
| Figura 1: Diferença de economia atômica entre a reação de esterificação e de transesterificação para obtenção de ésteres | 31 |
| Figura 2: Mecanismo de reação da esterificação | 32 |
| Figura 3: Comparação das etapas de processo de obtenção e purificação de ésteres pela via química e pela via enzimática | 41 |
| Figura 4: Mecanismo de atuação da tríade catalítica das lipases | 44 |
| Figura 5: Operações unitárias passíveis de serem adotadas nas etapas pós-reação em processos de produção de ésteres | 59 |
| Figura 6: Compilação de métricas de processo, fórmulas de cálculo e principal informação obtida com cada uma | 63 |
| Figura 7: Relação entre tamanho de partícula e operação de separação mais adequada | 64 |
| Figura 8: Estruturação de um estudo de viabilidade técnico-econômica a partir de modelagem e simulação de processos | 78 |
| Figura 9: Etapas conceituais da tese | 82 |
| Figura 10: Metodologias reacionais e analíticas principais da tese | 88 |
| Figura 11: Exemplo de cálculo estequiométrico da concentração de produtos nas reações em sistema multicompetitivo | 91 |
| Figura 12: Diagrama simplificado de fluxo de processo para obtenção biocatalítica de acetato de etila, acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila em sistema multicompetitivo em reator de coluna de bolhas com Novozym 435 | 92 |
| Figura 13: (a) Evolução da conversão (%) dos ácidos à ésteres e (b) concentração de água no meio orgânico ao longo do tempo nas reações em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oléico com etanol e <i>n</i> -octanol catalisadas por Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm), 50 °C, 100 U de carga de biocatalisador, em 4 diferentes condições reacionais – 1:1 e 1:2 sem peneira molecular (sp) e com peneira molecular (cp) | 111 |
| Figura 14: Evolução da conversão (%) dos ácidos à ésteres ao longo do tempo nas reações individuais de síntese do acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila e em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oléico com etanol e <i>n</i> -octanol. Todas as reações foram catalisadas por Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm), 50 °C, 100 U de carga de biocatalisador, na condição de razão molar ácidos:álcoois 1:1 cp (com peneira molecular) | 119 |

Figura 15: Variação da conversão (%) dos ácidos à ésteres em reações sequenciais com a mesma carga de biocatalisador para avaliação do reuso da Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm) em diferentes condições reacionais, com dados de concentração dos reagentes de cadeia curta e produtividade catalítica em cada caso. (a) Reação em sistema multicompetitivo 1:1 cp (b) Síntese do acetato de octila 1:2 cp (c) Síntese do oleato de octila 1:1 cp (d) Reação em sistema multicompetitivo 1:1 sp (e) Síntese do acetato de octila 1:2 sp; (f) Síntese do oleato de octila 1:1 sp; (g) Síntese do caprato de etila 1:1 sp. Todas as reações foram catalisadas por Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm), 50 °C, 100 U de carga de biocatalisador

130

Figura 16: Aspecto do meio reacional ao término das reações (após 4 h) em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico, oléico com etanol e *n*-octanol nas condições 1:1 e 1:2 com e sem presença de peneira molecular 3Å catalisadas por Novozym 435

131

Figura 17: (a) Diagrama esquemático do protótipo de reator de coluna de bolhas desenvolvido no LABIC/INT ; (b) protótipo de reator de coluna de bolhas em utilização

132

Figura 18: Variação da conversão em função da razão molar nas reações em sistema multicompetitivo no protótipo de reator de coluna de bolhas. Reações conduzidas por 3 h, à 50 °C, carga de biocatalisador Novozym 435 1,3% m/m

136

Figura 19: Variação da conversão dos ácidos à ésteres em reações sequenciais, para estudo de reusabilidade da Novozym 435 na reação em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oléico com etanol e *n*-octanol conduzida em protótipo de reator de coluna de bolhas. Condição reacional: carga de biocatalisador 1,3% m/m, 50 °C, razão molar ácidos:álcoois 1:1,3, em ciclos de 3 h e 2 h de reação

142

Figura 20: Seções de *upstream* e reação na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13

147

Figura 21: Seção de *downstream* para remoção dos componentes leves e separação do acetato de etila na modelagem da produção obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13

148

Figura 22: Seção de *downstream* para remoção dos componentes de cadeia média e separação do acetato de octila e caprato de etila na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13

149

Figura 23: Seção de *downstream* para remoção dos componentes de cadeia média/longa e separação do oleato de etila, caprato de octila e oleato de octila na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13

150

Figura 24: Seção de *downstream* para remoção dos componentes de cadeia curta/média/longa e separação das concentrações remanescentes de acetato de octila, caprato de etila e oleato de etila na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13

151

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----------|
| Tabela 1: Ésteres e suas aplicações | 25 |
| Tabela 2: Ésteres em formulações de produtos cosméticos do cotidiano | 26 |
| Tabela 3: Projeções de mercado para diferentes ésteres de relevância industrial | 26 |
| Tabela 4: Propriedades físico-químicas de alguns ésteres alifáticos | 28 |
| Tabela 5: Propriedades físicas de alguns ácidos carboxílicos e álcoois | 34 |
| Tabela 6: Tipos de suporte de imobilização para lipases, características gerais e exemplos de aplicação para lipases comumente estudados | 51 |
| Tabela 7: Variação da atividade de esterificação da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> em reações de esterificação do ácido hexanóico com 1-fenil-etanol em <i>n</i> -hexano. | 52 |
| Tabela 8: Modificação das propriedades das enzimas potencialmente obtidas pela imobilização | 53 |
| Tabela 9: Características das lipases imobilizadas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM | 57 |
| Tabela 10: Compilação de estudos de síntese enzimática de ésteres com lipases imobilizadas que incluem avaliação do reuso do biocatalisador na condição reacional considerada como ótima. | 70 |
| Tabela 11: Vantagens e desafios da biocatálise aplicada a produção de ésteres | 74 |
| Tabela 12: Custos de matérias-primas e valor de venda dos produtos para modelagem e simulação do processo de obtenção biocatalítica de ésteres dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e <i>n</i> -octanol em sistema multicompetitivo | 93 |
| Tabela 13: Itens de custo operacional e premissas técnicas/econômicas para modelagem e simulação do processo para obtenção biocatalítica de ésteres dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e <i>n</i> -octanol em sistema multicompetitivo | 94 |
| Tabela 14: Atividade enzimática de esterificação para as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM medidas a partir de reação 1:1 entre ácido oleico e etanol à 40 °C | 96 |
| Tabela 15: Comparação das esterificações enzimáticas individuais dos ácidos acético, cáprico e oleico com os álcoois etanol e <i>n</i> -octanol e o sistema multicompetitivo destes ácidos e álcoois reagindo simultaneamente, em condição equimolar e excesso estequiométrico do(s) álcool(is) com diferentes biocatalisadores em meios sem solvente | 97 |

| | |
|--|------------|
| Tabela 16: Características dos meios reacionais nas esterificações individuais entre ácidos e álcoois e na esterificação em sistema multicompetitivo | 112 |
| Tabela 17: Métricas de processo das reações individuais entre ácidos e álcoois e das reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Novozym 435 (100 U) em frasco agitado | 123 |
| Tabela 18: Comparativo de métricas de processo (em base molar) de sínteses enzimáticas de ésteres descritas na literatura utilizando lipases imobilizadas comerciais com as reações em sistema multicompetitivo | 124 |
| Tabela 19: Métricas de processo das reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Novozym 435 em protótipo de reator de coluna de bolhas após 3 h de reação e em frasco agitado após 4 h de reação | 142 |
| Tabela 20: Capacidade de produção de plantas industriais de ésteres | 146 |
| Tabela 21: Balanços de massa e energia da modelagem e simulação da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e <i>n</i> -octanol, em produção contínua (7920 h de operação ano ⁻¹) e capacidade média de produção de 6000 ton ano ⁻¹ | 152 |
| Tabela 22: Parâmetros econômicos de avaliação preliminar de viabilidade técnico-econômica da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e <i>n</i> -octanol, em produção contínua (7920 h de operação ano ⁻¹) e capacidade média de produção de 6000 ton ano ⁻¹ | 153 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------------|---|
| % m/m | percentual massa por massa |
| % m/v | percentual massa por volume |
| AC | Ácido Carboxílico |
| Alc | Álcool |
| ANOVA | Análise de variância |
| CAPEX | <i>Capital Expenditure</i> – Custos de capital |
| cp | com peneira molecular |
| g L ⁻¹ | Concentração em gramas por litro |
| IAV | Índice de Agregação de Valor |
| IRR | <i>Internal Rate Return</i> – Taxa Interna de Retorno |
| logP | Coeficiente de partição água-octanol |
| mol L ⁻¹ | Concentração em mol por litro |
| NPV | <i>Net Present Value</i> – Valor Presente Líquido |
| OPEX | <i>Operational Expenditure</i> – Custos operacionais |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| pKa | Constante de dissociação ácida |
| ppm | Partes por milhão |
| RM IM | Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> imobilizada em resina aniônica |
| rpm | Rotações por minuto |
| SFS | <i>Solvent-free systems</i> – Sistemas sem solvente |
| sp | sem peneira molecular |
| STR | <i>Stirred Tank Reactors</i> – Reatores agitados |
| STY | <i>Space-Time Yield</i> – Produtividade volumétrica |

| | |
|-------|---|
| TL IM | Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em resina aniônica |
| U | Unidade de atividade enzimática |
| USD | <i>United States Dollars</i> – Dólares americanos |
| VPL | Valor Presente Líquido |

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 24 |
| 2.1. ÉSTERES – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS, APLICAÇÕES E MERCADO | 24 |
| 2.2. ROTAS DE PRODUÇÃO DE ÉSTERES | 24 |
| 2.3. ERRO! Indicador não definido. | |
| 2.4. ASPECTOS AMBIENTAIS E ECONÔMICOS DA REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO | 37 |
| 2.5. ERRO! Indicador não definido. | |
| 2.6. ERRO! Indicador não definido. | |
| 2.7. ERRO! Indicador não definido. | |
| 2.8. ERRO! Indicador não definido. | |
| 2.8.1. Erro! Indicador não definido. | |
| 2.8.2. Erro! Indicador não definido. | |
| 2.9. ERRO! Indicador não definido. | |
| 2.10. ERRO! Indicador não definido. | |
| 3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA | 79 |
| 4. OBJETIVOS | 81 |
| 4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 81 |
| 5. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.1. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.2. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.3. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.4. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.5. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.6. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.7. ERRO! Indicador não definido. | |
| 5.8. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 95 |
| 6.1. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6.1.1. Erro! Indicador não definido. | |
| 6.1.2. Erro! Indicador não definido. | |
| 6.1.3. Erro! Indicador não definido. | |
| 6.2. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6.3. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6.4. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6.5. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6.6. ERRO! Indicador não definido. | |
| 6.6.1. Erro! Indicador não definido. | |
| 6.6.2. Erro! Indicador não definido. | |
| 7. CONCLUSÕES | 157 |
| 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS | 159 |
| 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 161 |
| 10. ANEXOS | 191 |

1. INTRODUÇÃO

Ésteres são compostos orgânicos de grande utilidade industrial no setor cosmético, de higiene pessoal e limpeza, alimentício, farmacêutico e de combustíveis, cujos mercados movimentam cifras bilionárias a cada ano (Khan e Rathod, 2015; Cecilia *et al.*, 2020; Khan *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2021a). As reações de esterificação entre um ácido carboxílico e um álcool demandam, em geral, catalisadores ácidos, como o ácido sulfúrico, em nível industrial. Entretanto, muitos subprodutos podem ser formados devido à baixa especificidade dos catalisadores convencionais, exigindo cuidadosa purificação pós-reação (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013). A severidade dos processos – altas temperaturas e uso de insumos corrosivos/tóxicos – traz consigo impactos ambientais elevados, em dissonância com as atuais tendências de busca de uma química mais sustentável e segura (Thum e Oxenbøll, 2008).

A biocatálise – catálise promovida por enzimas (lipases em forma livre ou imobilizadas) – promove maior especificidade em condições brandas de temperatura e pressão, produzindo ésteres de forma mais amigável ao meio ambiente, com ganhos operacionais em relação aos processos convencionais (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013). O uso de lipases imobilizadas (enzimas ligadas a um suporte sólido) permite uma fácil separação pós-reação e o reuso dos biocatalisadores. Além disso, a imobilização pode auxiliar na melhoria da estabilidade operacional em meios orgânicos e na viabilidade de sínteses que envolvam ácidos relativamente fortes e reagentes altamente hidrofílicos (Adlercreutz, 2013; Rodrigues *et al.*, 2019; Bolívar, Woodley e Fernandez-Lafuente, 2022). Muitos estudos sobre a produção de ésteres usando lipases imobilizadas vem sendo publicados na literatura científica ao longo das últimas décadas (Rodrigues & Fernandez-Lafuente, 2010; Khan e Rathod, 2015; Sá *et al.*, 2017; Ortiz *et al.*, 2019; Dutra *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2023a). Apesar das vantagens citadas e do vasto conhecimento sobre o assunto, lipases imobilizadas são insumos custosos e ainda pouco competitivos em relação aos catalisadores convencionais, o que restringe sua ampla adoção em escala industrial até o momento (Sousa *et al.*, 2023a). Assim, o aproveitamento das vantagens da biocatálise para a síntese de ésteres (assim como para outras *commodities* e especialidades químicas) ainda permanece um desafio tecnológico/econômico.

O reuso das lipases imobilizadas é a principal estratégia para atenuar o impacto do custo do biocatalisador no processo, de modo que quanto maior o reuso do biocatalisador,

menor o impacto do custo do mesmo no custo dos ésteres obtidos (Sousa *et al.*, 2021a, Sousa *et al.*, 2023a). Outra estratégia custo-efetiva para a biocatálise é realizar as sínteses em sistemas livre de solventes (SFS), aumentando a produtividade volumétrica, reduzindo custos e operações pós-reação (Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b). Todavia, as lipases imobilizadas em SFS são muito suscetíveis a sofrer inibição enzimática e desfavorecimento cinético quando ácidos e álcoois de cadeia curta estão envolvidos (Sousa *et al.*, 2021b; Sousa *et al.*, 2021c; Mangiagalli *et al.*, 2022), bem como ter limitada reusabilidade em condições reacionais mais severas.

A síntese de ésteres de cadeia curta (menores que 10 carbonos) por via biocatalítica é particularmente desafiadora, já que os reagentes de cadeia curta propiciam meios reacionais mais hidrofílicos e ácidos, desfavorecendo a atuação das lipases, tendo grande potencial inibidor/inativador sobre estas (Flores *et al.*, 2000; Belafi-Bakó *et al.*, 2003; Hasegawa, Azuma e Takahashi, 2008; Nordblad e Adlercreutz, 2008; Mangiagalli *et al.*, 2022). As estratégias comumente descritas na literatura para a síntese enzimática de ésteres de cadeia curta para atingimento de altas conversões acabando tendo impacto negativo em outras métricas de processo – adoção de altas cargas de biocatalisador (para compensar as restrições cinéticas causadas pelos reagentes), uso de solventes hidrofóbicos ou razões molares elevadas (para atenuar a hidrofilicidade dos reagentes, reduzir a acidez e a concentrações dos inibidores) e longos tempos de processo (Tufvesson *et al.*, 2011a, Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014; Sousa *et al.*, 2021c). Estas estratégias levam à baixas concentrações de produto ao término da reação, baixas produtividades volumétricas, maiores custos de investimento (reatores de maior volume em sínteses de longa duração e em presença de solventes) e maiores custos operacionais (energia, biocatalisador, reagente em excesso estequiométrico).

As lipases são biocatalisadores específicos em relação ao tipo de reação que catalisam (esterificação-hidrólise), mas o podem fazê-lo a partir de uma ampla variedade de substratos – cadeias curta, média ou longa, ramificada, alifática, mono ou polifuncional, dentre outros (Kapoor e Gupta, 2012; Park e Park, 2022). Misturas de diferentes de ácidos e álcoois de diferentes tamanhos de cadeia são adotadas para estudar a seletividade das lipases em relação a qual substrato será convertido mais rapidamente (Rangheard, Triantaphylides e Baratti, 1989; Lee e Parkin, 2000). Essas misturas são chamadas de sistemas multicompetitivos. Contudo, tendo em vista o desafio acima exposto da síntese de ésteres de cadeia curta, pode-

se adotar um sistema multicompetitivo de diferentes tamanhos de cadeia não apenas para o estudo da seletividade, mas também para a obtenção de ésteres de diferentes tamanhos de cadeia simultaneamente no mesmo meio reacional. A mistura de ácidos e álcoois de diferentes tamanhos pode proporcionar os mesmos efeitos que um solvente hidrofóbico traria na síntese de ésteres de cadeia curta – aumento da hidrofobicidade geral do meio, redução da concentração dos inibidores mais potentes e da acidez – em uma abordagem ainda não descrita na literatura. Ao término da reação, forma-se uma mistura de ésteres, que pode ser separada por operações unitárias comuns da indústria química, como a destilação. Ao invés de separar produto de solvente, ao término da reação se separa produto de produto, como um caminho possível para viabilizar a síntese de ésteres de cadeia curta sem solventes, mantendo as métricas de processos nos patamares requeridos para aplicação industrial. Desta forma, sistemas multicompetitivos podem ser utilizados não apenas para o estudo de características próprias dos biocatalisadores, mas para o desenvolvimento de um processo que aponte para viabilidade técnico-econômica, de modo a aproveitar as vantagens trazidas pela biocatálise no contexto da indústria química.

Uma avaliação mais aprofundada das métricas de processo, que incluem a conversão, a produtividade volumétrica e a produtividade catalítica (diretamente relacionada ao reuso do biocatalisador), e o uso de ferramentas computacionais para modelagem e simulação de processos podem auxiliar no desenvolvimento de processos de obtenção de ésteres baseados em sistemas multicompetitivos com lipases imobilizadas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo, apresenta-se o contexto científico e tecnológico no qual se insere esta tese. A definição, produção e importância dos ésteres para diferentes setores industriais; os principais aspectos físicos, químicos, econômicos e ambientais da reação de esterificação e dos processos de produção de ésteres; as lipases imobilizadas como biocatalisadores para a obtenção de ésteres, suas vantagens e desvantagens; aspectos de engenharia química e análise econômica preliminar de um processo biocatalítico para este fim.

2.1 Ésteres – caracterização química, propriedades físico-químicas, aplicações e mercado

Ésteres são compostos orgânicos oxigenados derivados dos ácidos carboxílicos. Sua estrutura química possui um grupo carbonila (C=O) ligado a um radical alquil (-R) e um radical alcóxil (RO-), conforme mostrado na Eq. 1 (Fieser e Fieser, 1959). Em sua maioria, são compostos hidrofóbicos, com hidrofobicidade crescente à medida que cresce o tamanho da cadeia carbônica. Suas propriedades físico-químicas mais marcantes dependem, em grande parte, do tamanho total da cadeia orgânica – ésteres de cadeia curta são menos hidrofóbicos e voláteis, de aroma agradável; ésteres de cadeia média tem propriedades emolientes e ésteres de cadeia longa tem propriedades lubrificantes e plastificantes, devido à capacidade de “empacotamento” de suas moléculas (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Cecilia *et al.*, 2020; Khan e Rathod, 2015; Sá *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2021a). E, dessas propriedades, decorrem suas principais aplicações nas indústrias alimentícia, cosmética, de combustíveis, de produtos de limpeza, de materiais poliméricos e resinas, dentre outros. A Tabela 1 compila alguns dos principais exemplos.

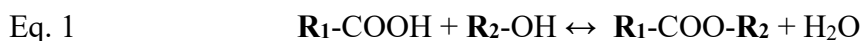


Tabela 1: Ésteres e suas aplicações

| Molécula | Fórmula | Aplicações – Setores Industriais |
|-------------------------|-------------------|--|
| Acetato de Etila | $C_4H_8O_2$ | Solvente/Plastificante – tintas, vernizes, resinas, plásticos Solvente/Veículo – cosméticos, perfumaria Agente flavorizante/aroma – alimentos Solvente/Intermediário – indústria química/farmacêutica |
| Acetato de Butila | $C_6H_{12}O_2$ | Agente flavorizante/aroma – alimentos Solvente/Intermediário – indústria química/farmacêutica |
| Acetato de Benzila | $C_9H_{10}O_2$ | Fragrância – perfumaria |
| Acetato de Vinila | $C_4H_6O_2$ | Base para polímeros - plásticos, fibras, tintas (PVA) |
| Acrilato de Metila | $C_4H_6O_2$ | Base para polímeros – plásticos, fibras (PMMA) |
| Valerato de Etila | $C_7H_{14}O_2$ | Agente flavorizante/aroma – alimentos Fragrância – perfumaria |
| Salicilato de metila | $C_8H_8O_3$ | Fragrância – perfumaria Princípio ativo – indústria farmacêutica |
| Caprilato de Metila | $C_9H_{18}O_2$ | Agente flavorizante/aroma – alimentos Fragrância – perfumaria Emoliente - cosméticos |
| Miristato de isopropila | $C_{17}H_{34}O_2$ | Emoliente - cosméticos |

Fontes: Shreve e Shreve, 1977; PubChem

Pela ampla variedade de aplicações, ésteres estão muito presentes em produtos cotidianos. Para exemplificar, a Tabela 2 mostra uma breve compilação de produtos comerciais de uso doméstico que possuem ésteres em sua formulação. O mercado para essas substâncias é vultoso e envolve bilhões de dólares em cifras anuais (Khan e Rathod, 2015; Sousaa *et al.*, 2023a; Sousa *et al.*, 2021b). A variedade de aplicações dificulta a apresentação de um quadro único de tamanho de mercado e, por isso, adotou-se uma estratificação considerando algumas moléculas, conforme mostrado na Tabela 3. Várias das maiores indústrias químicas do mundo produzem ésteres para alguma aplicação, conforme pode ser encontrado em seus portfólios de produtos disponíveis na internet. A multinacional alemã Basf® SE produz ésteres (emolientes) para cosméticos e poliésteres para plásticos e fibras; a multinacional norte-americana Dow® Chemicals produz ésteres do ácido acrílico e solventes

como acetato de propila, acetato de butila e propionato de pentila para resinas e tintas; a norte-americana Exxon Mobil® produz ésteres ramificados como emolientes e emulsificantes; a também norte-americana IFF® produz um amplo leque de ésteres para indústrias alimentícias (realçadores de aroma e sabor) e fragrâncias; a suíça Clariant® produz ésteres do glicerol como agente dispersante em produtos agrícolas e ésteres emulsificantes; o acetato de etila é produzido pela companhia belga Solvay®, dentre vários outros exemplos possíveis.

Tabela 2: Ésteres em formulações de produtos cosméticos do cotidiano

| Produto | Éster(es) presente(s) |
|-----------------------------|---|
| Sabonete infantil (líquido) | Citrato de tributila |
| Creme hidratante | Oleato de etila Coco caprato/Coco |
| Condicionador para barba | caprilato (mistura de ésteres de cadeia longa) |
| Condicionador para cabelos | Ésteres cetílicos, Benzoato de benzila Oleato de glicerila, Oleato |
| Creme para limpeza de pele | de etila, Linoleato de etila, Salicilato de amila |
| Demaquilante | Miristato de isopropila Salicilato de metila, |
| Pomada para dor muscular | Estearato de glicerila, Miristato de isopropila |

Fonte: O Autor. 2024

Tabela 3: Projeções de mercado para diferentes ésteres de relevância industrial

| Molécula | Aplicação | Dados de mercado | Referência |
|------------------|--|--|------------------|
| Acetato de etila | Solvente verde / Intermediário Químico | Estimativa de volume produzido até 2030 - 6,5 milhões de toneladas Taxa de crescimento CAGR de 3,82% de 2023 a 2030 | Chem Analyst.com |
| Acetato de | Componente de | Estimativa de volume | Chem |

| | | | |
|-------------------------------|---|--|---------------------------------|
| vinila | colas, tintas, precursor de plásticos, fibras | produzido até 2030 - 10,0 milhões de toneladas Taxa de crescimento CAGR de 4,41% de 2023 a 2032 | Analyst.com |
| Coco caprilato /caprato | Emoliente para cosméticos | Estimativa de mercado de 32,2 milhões de dólares em 2024 Taxa de crescimento CAGR de 3,9% até 2031 | Proficient Market Insight |
| Miristato de isopropila | Emoliente para cosméticos | Estimativa de mercado de 70,7 milhões de dólares em 2022 Taxa de crescimento CAGR de 7,5% de 2023 a 2030 | Global Markets Insight Inc. |
| Oleato de butila | Emoliente, plastificante, lubrificante | Estimativa de mercado de 70,1 milhões de dólares em 2023 Taxa de crescimento CAGR de 9,1% de 2024 a 2031 | Market Research Intellect |
| Monoestearato de glicerila | Surfactante, emulsificante | Estimativa de mercado de 1,75 bilhões de dólares em 2023 Taxa de crescimento CAGR de 6,2% de 2024 a 2030 | Grand View Research |

CAGR = *Compound Annual Growth Rate* (Taxa de Crescimento Anual Composta)

Além da grande relevância industrial, os ésteres são compostos de ocorrência natural. Os óleos vegetais são, quimicamente, ésteres graxos do glicerol (triglicerídeos) (Abdelmoez e Mustafa, 2014). O óleo de coco (*Cocos nucifera*), por exemplo, é rico em triglicerídeos de cadeia média, particularmente entre 10 a 14 carbonos na cadeia graxa (Marina *et al.*, 2009). Muitos outros ésteres também fazem parte da composição de óleos vegetais, como o óleo de

jasmim (*Jasminum officinale*), de gerânio (*Pelargonium hortorum*), de gaultéria (*Gaultheria procumbens* L.) (Shreve e Brinks, 1977) e óleos de insetos, como os de vários tipos de moscas (*Musca domestica*, *Hermetia illucens* L., *Boettcherisca peregrine*) (Cai *et al.*, 2017). Nos frutos os ésteres também se fazem presentes, como por exemplo, na maçã (*Malus domestica* Borkh), cujo aroma deve-se a presença de formiato e acetato de amila em meio a outros compostos, os cinamatos de etila e benzila no damasco (*Prunus armeniaca*), o propionato de benzila e propionato de cinamila no melão e o benzoato de butila no morango (Sá *et al.*, 2017; Shreve e Brinks, 1977). O metabolismo de alguns microorganismos também pode produzir ésteres em quantidades minoritárias; na fermentação alcoólica de glicose conduzida pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* em condições anaeróbicas foram identificadas baixas concentrações de acetato de etila, acetato de isoamila e carbamato de etila (Kruis *et al.*, 2019).

Ésteres geralmente tem pontos de ebulição menores do que ácidos carboxílicos e álcoois de massa molecular similar; por exemplo o acetato de propila (massa molar: 102,13 g mol⁻¹) tem ponto de ebulição 102 °C, ao passo que o hexanol e o ácido pentanóico com massas molares muito próximas a este éster tem pontos de ebulição 156 °C e 187 °C, respectivamente (Fieser e Fieser, 1959). Ésteres de cadeia curta, com estruturas menores que 10 carbonos como o formato de metila (C2) e o valerato de butila (C9) tem pontos de ebulição que vão de 31,5 °C a 185,8 °C, respectivamente, e coeficientes de partição octanol-água (logP) 0,03 (hidrofílico) e 2,7 (hidrofóbico), respectivamente. Os ésteres de cadeia média e longa são marcadamente hidrofóbicos. A solubilidade dos ésteres também depende do tamanho da cadeia. Ésteres de cadeia curta, apesar de polares, tem baixa solubilidade em água (devido à ausência de ligações de hidrogênio), como pode ser exemplificado pela baixa solubilidade do acetato de butila na água: 1-5 g L⁻¹ (PUBCHEM, 2004). Ésteres de maior tamanho de cadeia são solúveis em solventes hidrofóbicos, como os hidrocarbonetos (hexano, heptano, tolueno, dentre outros). A Tabela 4 compila algumas propriedades físico-químicas de ésteres de diferentes tamanhos de cadeia.

Tabela 4: Propriedades físico-químicas de alguns ésteres alifáticos

| Molécula | Fórmula | Estado físico | Densidade | Ponto de fusão | Ponto de ebulição |
|-------------------|--|---------------|-----------|----------------|-------------------|
| Formato de metila | C ₂ H ₄ O ₂ | Líquido | 0,98 | -100 °C | 32 °C |
| Formato de etila | C ₃ H ₆ O ₂ | Líquido | 0,92 | - 80 °C | 54 °C |
| Acetato de | C ₄ H ₈ O ₂ | Líquido | 0,90 | - 84 °C | 77 °C |

| | | | | | |
|--------------------------|-------------------|---------|------|---------|--------|
| etila | | | | | |
| Acetato de butila | $C_6H_{12}O_2$ | Líquido | 0,88 | - 78 °C | 126 °C |
| Acetato de octila | $C_{10}H_{20}O_2$ | Líquido | 0,87 | - 39 °C | 206 °C |
| Valerato de etila | $C_7H_{14}O_2$ | Líquido | 0,87 | - 91 °C | 145 °C |
| Caproato de etila | $C_8H_{16}O_2$ | Líquido | 0,87 | - 68 °C | 167 °C |
| Caprilato de butila | $C_{12}H_{24}O_2$ | Líquido | 0,86 | -43 °C | 245 °C |
| Caprato de etila | $C_{12}H_{24}O_2$ | Líquido | 0,86 | -20 °C | 245 °C |
| Caprato de octila | $C_{18}H_{36}O_2$ | Líquido | 0,86 | -1 °C | 130 °C |
| Laurato de butila | $C_{16}H_{32}O_2$ | Líquido | 0,86 | -7 °C | 180 °C |
| Palmitato de isopropila | $C_{19}H_{38}O_2$ | Sólido | 0,85 | 14 °C | 342 °C |
| Monoesteato de glicerila | $C_{21}H_{42}O_4$ | Sólido | 0,97 | 78 °C | 410 °C |
| Oleato de etila | $C_{20}H_{38}O_2$ | Líquido | 0,87 | -32 °C | 217 °C |
| Oleato de octila | $C_{26}H_{50}O_2$ | Líquido | 0,87 | - | 469 °C |
| Estearato de cetila | $C_{34}H_{68}O_2$ | Sólido | - | 57 °C | 528 °C |

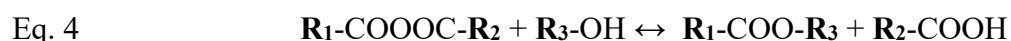
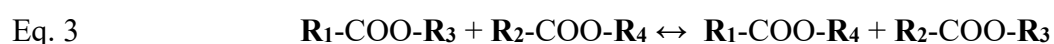
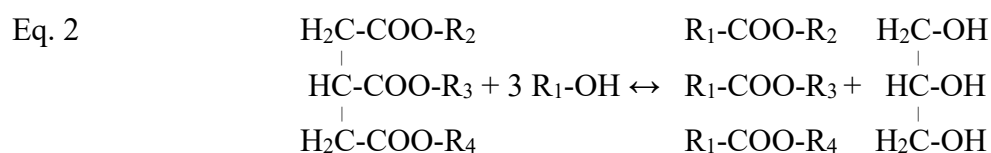
Fontes: Chemical Book; Pubchem

Os ésteres são, dentre os compostos derivados dos ácidos carboxílicos, um dos menos reativos. Em contato com a água, por exemplo, um éster como o acetato de metila pode levar dias para reagir em temperatura ambiente. Isso se dá pelos efeitos de ressonância, no qual o carbono da carbonila não fica tão positivamente carregado (isto é, não tão reativo) quanto em outros compostos derivados dos ácidos carboxílicos, como os halogenetos ácidos ou os anidridos (Allinger *et al.*, 1976). A hidrólise de ésteres, por este motivo, é um processo que ocorre espontaneamente apenas em taxas reacionais muito lentas.

2.2 Rotas de produção de ésteres

As fontes naturais de ocorrência de ésteres apresentam, em geral, baixas concentrações destes, com exceção dos óleos naturais. Por isso, processos físico-químicos de extração não

são normalmente considerados como alternativas viáveis para a obtenção de ésteres em escala industrial (Abbas e Comeau, 2003; Gao *et al.*, 2016; Gumel e Annuar, 2016; Romero *et al.*, 2005; Sá *et al.*, 2017). Tendo em vista a abundância de óleos vegetais e o fato de serem recursos renováveis, uma das rotas possíveis de se obter ésteres é através da hidrólise completa (utilizando um catalisador) dos triglicerídeos para obtenção dos ácidos graxos livres e, posteriormente, a reação dos ácidos com um álcool para obter o éster (Eq. 1) (Abdelmoez e Mustafa, 2014; Sun *et al.*, 2013). A reação de esterificação pode se dar a partir de ácidos e de álcoois obtidos por outras rotas, como por exemplo, a via fermentativa dos açúcares ou a partir de hidrocarbonetos do petróleo. Para contornar a sequência de reações de hidrólise que geram ácidos graxos livres, todavia, pode-se adotar a transesterificação dos óleos vegetais. A reação de transesterificação envolve a substituição do esqueleto carbônico do glicerol (poliálcool) por outro(s) álcool(is), na reação de um triglicerídeo com um álcool, obtendo até 3 moléculas de éster na reação e o glicerol como subproduto (Eq. 2) (Moazeni, Chen e Zhang, 2019). Esta rota é amplamente adotada para aproveitamento de óleos vegetais, para melhoramento de lipídios de origem animal e para produção de biodiesel (ésteres metílicos/etílicos de ácidos graxos). A transesterificação também pode se dar entre ésteres monofuncionais e alifáticos (Eq. 3) com as reações de interesterificação. Outra rota possível para a obtenção de ésteres é a reação entre anidridos ácidos (Eq. 4) (Allinger *et al.*, 1976; Khan *et al.*, 2021; Shreve e Brinks, 1977). Industrialmente, as vias da esterificação/transesterificação são as mais comumente adotadas, em processos endotérmicos dependentes da presença de catalisadores/biocatalisadores, como a obtenção do acetato de etila pela esterificação direta do ácido acético, a obtenção do salicilato de metila, a produção de precursores dos poliésteres por esterificação direta do ácido tereftálico com o metanol, dentre outros (Shreve e Brinks, 1977).



Um conceito importante na comparação entre as rotas de produção é a economia atômica (Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014). A economia atômica consiste na avaliação do total de átomos dos reagentes que são incorporados ao produto de uma reação. A economia atômica é um dos Princípios da Química Verde, conforme proposto por Anastas e Eghbali (Anastas e Eghbali, 2010). No caso da transesterificação, a reação entre um triéster e um monoálcool gera como produtos 3 moléculas de éster e o glicerol; no caso da esterificação, gera-se como produtos 1 molécula de éster e água. Tomando-se como exemplo a obtenção do éster butirato de metila pelas duas rotas, conforme mostrado na Figura 1, tem-se que a economia atômica por transesterificação seria igual a 77% e por esterificação seria de 85%. Sob esta ótica, então, a esterificação seria um processo mais verde do que a transesterificação.

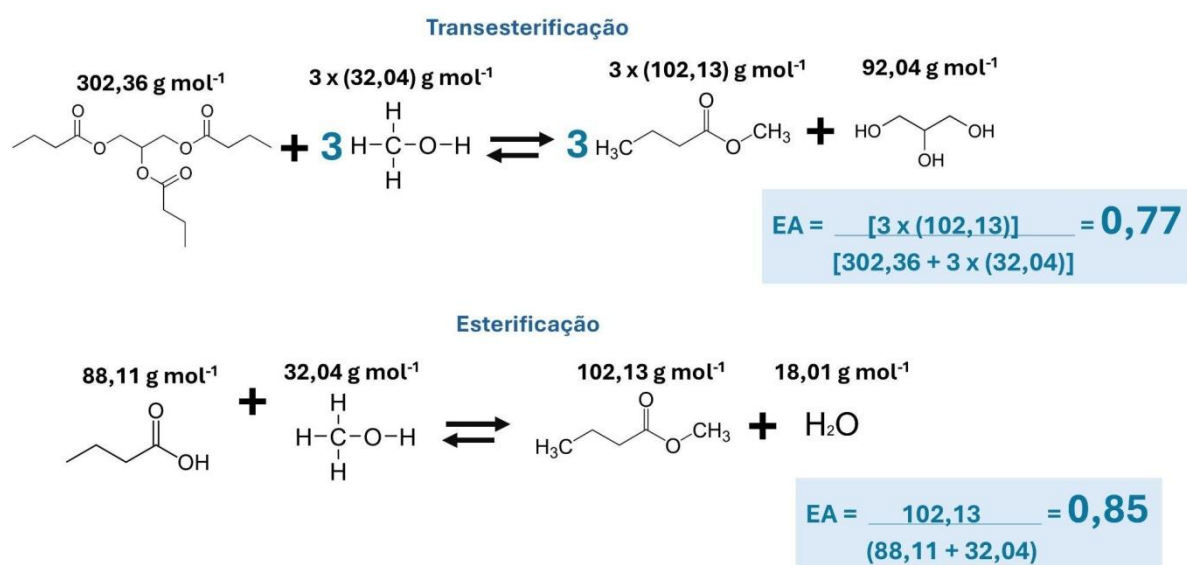


Figura 1: Diferença de economia atômica entre a reação de esterificação e de transesterificação para obtenção de ésteres

Outra métrica de comparação entre rotas de produção é a eficiência de carbono, que preconiza quantos átomos de carbono da matéria-prima são aproveitados no produto final (Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014). Neste caso, a esterificação também leva vantagem em relação à transesterificação, já que todos os carbonos dos reagentes são incorporados no éster formado, ao passo que na transesterificação, 3 carbonos do triglicerídeo são eliminados como glicerol (Figura 1). Além disso, a esterificação tem como matérias-primas reagentes amplamente disponíveis (ácidos e álcoois) em quantidades industriais, o que

não representa um gargalo para sua ampla adoção na obtenção de ésteres ou ser preterida em relação a transesterificação.

2.3 A reação de esterificação – mecanismo de reação, reagentes, catalisadores, e aspectos físico-químicos

A reação entre ácidos carboxílicos e álcoois para formação de ésteres vem sendo estudada desde o século XIX, sendo descrita por Fisher & Speier em 1895 (Allinger *et al.*, 1976; Fieser e Fieser, 1959; Khan *et al.*, 2021). Assim como na química inorgânica, é uma reação de neutralização de um ácido gerando água, cujo produto principal é resultante da condensação das carboxilas (-COOH) com um radical alquil (-R) e eliminação de um hidrogênio.

O mecanismo da reação se dá a partir da protonação da carbonila do ácido carboxílico, forçando o deslocamento de um par de elétrons desta, tornando o carbono mais eletrofílico. A carbonila, então ativada, favorece um ataque nucleófilo pelo álcool, levando à formação do intermediário tetraédrico, que, rearranjado elimina a água, forma o éster e se desprotona, conforme Figura 2.

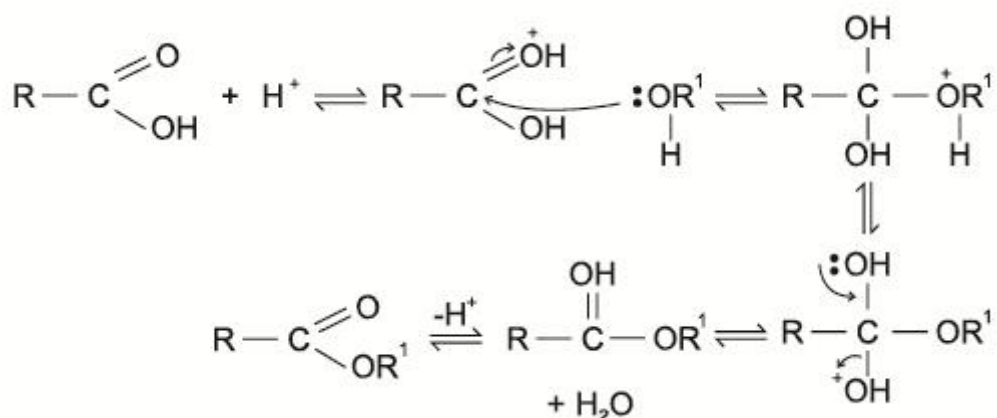


Figura 2: Mecanismo de reação da esterificação

Fonte: Adaptado de Allinger *et al.*, 1976

As reações de esterificação são processos espontâneos (ΔG negativo) em que há aumento de entropia do sistema (ΔS positivo) e são geralmente reações endotérmicas (ΔH positivo) (Castillo *et al.*, 2012; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021a). Apesar de espontâneas, esterificações ocorrem naturalmente sob taxas reacionais muito baixas (Khan *et al.*, 2021) e a reatividade dos ácidos carboxílicos tende a diminuir com o aumento do tamanho

de cadeia (Liu, Lotero e Jr, 2006). Para serem viabilizadas, as esterificações demandam a presença de um (bio)catalisador. Apenas em condições muito severas de reação, tais como temperaturas superiores a 200 °C e pressões acima de 10 atm, reações de esterificação podem se dar sem a necessidade de catalisadores (Khan *et al.*, 2021). Catalisadores ácidos, tais como o ácido sulfúrico ou o ácido clorídrico, podem ceder um próton à carbonila do ácido carboxílico, que fica facilmente suscetível a um ataque nucleófilo pela hidroxila dos álcoois (Allinger *et al.*, 1976; Fieser e Fieser, 1959).

Os ácidos sulfúrico e clorídrico, apesar de amplamente disseminados na indústria química, são produtos de alta corrosividade e toxicidade, com evidentes impactos ambientais e severos riscos ocupacionais associados ao seu uso e transporte. As fichas de segurança de produtos químicos (FISPQ) destes produtos reportam efeitos tais como a formação de névoas irritantes, reações violentas com a água e metais puros, potencial carcinogênico, queimaduras e lesões oculares graves quando em contato (“Produtos Químicos - CETESB”, [s.d.]). Outro ácido comumente utilizado nas reações de esterificação é o ácido *p*-toluenosulfônico, cujas vantagens são a menor toxicidade e menor corrosividade em relação ao ácido sulfúrico (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Khan *et al.*, 2021; Natalino, Cardoso e Fernandes, 2014). É um ácido sólido em temperatura ambiente e ponto de fusão 106 °C, que até pode viabilizar a catálise heterogênea em um meio reacional líquido, dependendo da temperatura da reação, mas usualmente também é tratado como catalisador homogêneo nas temperaturas usuais de esterificação em nível industrial (Liu, Lotero e Jr, 2006). Apesar de eficaz, o ácido *p*-toluenosulfônico tem baixa reciclabilidade devido à sua intensa capacidade de absorção de umidade e dissolução no meio reacional (Li *et al.*, 2021). A literatura também reporta exemplos bem-sucedidos de catálise utilizando resinas de troca iônica como Amberlite e zeólitas, sílica suportada em poliácidos e óxidos metálicos, ainda que estes catalisadores apresentem desvantagens significativas relacionadas à atividade catalítica, estabilidade térmica em altas temperaturas ou limitações de transferência de massa (Khan *et al.*, 2021; Liu, Lotero e Jr, 2006; Wang e Jiang, 2005; Zang *et al.*, 2013).

A reação de esterificação é um processo termodinamicamente controlado, em equilíbrio químico com a reação inversa, a hidrólise, na qual éster e água formam novamente os respectivos ácidos e álcoois de origem (Khan *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2021b). De acordo com o princípio de Le Chatelier, para deslocar o equilíbrio químico faz-se necessário: i) utilizar excesso estequiométrico de um dos reagentes; ii) remover um dos produtos formados.

A metodologia proposta por Fisher-Speier – a esterificação em refluxo sob forte aquecimento, na presença de ácido clorídrico ou sulfúrico como catalisador – tornou-se

amplamente adotada para desenvolvimentos em escala laboratorial e posterior escalonamento. Neste protocolo, prevê-se a utilização de grande excesso estequiométrico de álcool e a remoção contínua da água por evaporação (Allinger *et al.*, 1976; Fieser e Fieser, 1959).

Os reagentes – ácidos carboxílicos e álcoois – são em boa parte líquidos à temperatura ambiente. Ácidos carboxílicos saturados, alifáticos e monofuncionais até 9 carbonos são líquidos e álcoois alifáticos são líquidos até 12 carbonos, conforme mostrado na Tabela 5. O caráter hidrofílico ou hidrofóbico de ácidos e álcoois depende, em grande parte, do tamanho de sua cadeia carbônica, já que os grupos funcionais (-COOH e -OH) são polares. Ácidos e álcoois tendem a ser mutuamente miscíveis, o que, a priori, dispensa a necessidade de solventes que compatibilizem os reagentes. Quando a reação envolve um reagente sólido, é possível que este reagente esteja na forma líquida (fundido) devido à temperatura da reação ou esteja dissolvido no reagente líquido. Portanto, reações de esterificação geralmente ocorrem em fase líquida. Os ésteres são em grande parte líquidos em temperatura ambiente ou materiais cerosos de baixo ponto de fusão, conforme já mostrado na Tabela 4.

Tabela 5: Propriedades físicas de alguns ácidos carboxílicos e álcoois

| Molécula | Fórmula | Estado físico* | Ponto de fusão | Ponto de ebulição |
|-------------------|--|----------------|----------------|-------------------|
| Metanol | CH ₄ O | Líquido | -98 °C | 65 °C |
| Etanol | C ₂ H ₆ O | Líquido | -114 °C | 78 °C |
| Butanol | C ₃ H ₈ O | Líquido | -127 °C | 97 °C |
| <i>n</i> -Octanol | C ₈ H ₁₈ O | Líquido | -15 °C | 195 °C |
| Dodecanol | C ₁₂ H ₂₆ O | Líquido | 24 °C | 259 °C |
| Álcool cetílico | C ₁₆ H ₃₄ O | Sólido | 49 °C | 334 °C |
| Ácido fórmico | CH ₂ O ₂ | Líquido | 8 °C | 101 °C |
| Ácido acético | C ₂ H ₄ O ₂ | Líquido | 16 °C | 118 °C |
| Ácido butírico | C ₄ H ₈ O ₂ | Líquido | -5 °C | 164 °C |
| Ácido hexanóico | C ₆ H ₁₂ O ₂ | Líquido | -3 °C | 205 °C |
| Ácido cáprico | C ₁₀ H ₂₀ O ₂ | Sólido | 32 °C | 268 °C |
| Ácido mirístico | C ₁₄ H ₂₈ O ₂ | Sólido | 54 °C | 326 °C |
| Ácido palmítico | C ₁₆ H ₃₂ O ₂ | Sólido | 62 °C | 352 °C |
| Ácido oléico | C ₁₈ H ₃₄ O ₂ | Líquido | 13 °C | 360 °C |

Fontes: Chemical Book; Pubchem. *Em temperaturas usuais de países tropicais (25 °C, ao nível do mar).

Os catalisadores podem ser tanto líquidos (catálise homogênea) quanto sólidos (catálise heterogênea). A catálise homogênea é frequentemente utilizada industrialmente para a síntese de ésteres; o catalisador mais disseminado nesta aplicação – o ácido sulfúrico – é

também líquido nas temperaturas usuais de reação (acima de 100 °C). Em reações de transesterificação de óleos, como as adotadas para a síntese de biodiesel (ésteres metílicos de ácidos graxos), se utiliza amplamente catálise homogênea alcalina (soluções alcoólicas de KOH, gerando alcóxidos de potássio) (Moazeni, Chen e Zhang, 2019; Suarez e Meneghetti, 2015; Tabatabaei *et al.*, 2019). A ação do catalisador homogêneo se dá pelo contato direto deste com os reagentes em fase orgânica. Já na catálise heterogênea, há uma maior complexidade dos fenômenos físico-químicos envolvidos – difusão, absorção, adsorção – já que catalisador e meio reacional existem em fases diferentes; todavia, a catálise heterogênea supera amplamente a catálise homogênea em número geral de aplicações industriais, pela praticidade de utilização, permitindo o uso continuado em leitos fixos pelos quais os reagentes fluem, seu reaproveitamento, e um melhor controle dos processos (Baskar *et al.*, 2017; Poovan *et al.*, 2022; Richardson, 1989; Tabatabaei *et al.*, 2019).

O meio reacional inicial em uma esterificação é composto por ácido carboxílico, álcool e (bio)catalisador. Conforme a reação progride, formam-se o respectivo éster – um composto sempre mais hidrofóbico que seus reagentes de origem pelo aumento da cadeia carbônica – e a água como subproduto. A água pode ficar totalmente particionada, formando uma segunda fase microscópica, dependendo da extensão da reação e da hidrofobicidade do éster formado, ou dissolver-se parcialmente na fase do reagente/produto mais hidrofílico presente no meio reacional (Colombié *et al.*, 1998; Foresti *et al.*, 2007; Halling, 1990; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b). A formação de uma segunda fase em situações de alta hidrofobicidade naturalmente favorece a ocorrência da esterificação em detrimento da hidrólise, já que apenas a interface entre as fases está disponível para reagir e regenerar o ácido e o álcool a partir do éster e da água (Flores *et al.*, 2000; Foresti *et al.*, 2007, 2008; Halling, 1990; Sousa *et al.*, 2021b).

Pelo princípio de Le Chatelier, um processo termodinamicamente controlado requer excesso estequiométrico de um dos reagentes para que o equilíbrio químico seja deslocado na direção desejada. Neste sentido, em uma reação de esterificação sem solventes, na qual o meio reacional inicial é composto apenas por ácido e álcool, o excesso estequiométrico de um destes terá influência nas características do meio reacional (Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b). Como exemplo, na reação entre ácido palmítico e isopropanol em condição equimolar, o logP resultante da mistura, conforme a fórmula proposta por Laane (1987) (Laane *et al.*, 1987) é de 3,6, indicando que o meio reacional é hidrofóbico. Se por outro lado, a reação adota excessos estequiométricos tão grandes quanto a razão molar 1:15, como no estudo de Vadgama e co-autores (2015) (Vadgama, Odaneth e Lali, 2015), o logP é de 0,5,

indicando um meio reacional hidrofílico (Eq. 5). No caso de uma reação com solvente (concentrações baixas-moderadas dos reagentes) as características físico-químicas do meio reacional pouco se alteram no decorrer da reação, já que o solvente é a espécie química em maior quantidade no meio.

$$\text{Eq. 5} \quad \log P = x_1(\log P_1) + x_2(\log P_2)$$

Os ácidos carboxílicos são considerados, em grande parte, ácidos fracos (Kütt *et al.*, 2018). A constante de dissociação ácida, pKa, determina o grau de dissociação da molécula (gerando íons H^+) em solução aquosa, dado por uma relação de equilíbrio químico entre as formas dissociada (denominador) e não dissociada (numerador), conforme mostrado na Eq 6. Logo, quanto maior o valor do pKa, maior é a concentração da forma não dissociada no meio, menos íons H^+ são liberados em solução aquosa, contribuindo para menor acidez da solução. Para ácidos monofuncionais, os valores de pKa podem variar de 3,8 (ácido fórmico, C1) a valores menores que 5,0 para ácidos de cadeia mais longa (PUBCHEM, 2004). Ácidos inorgânicos fortes, como o ácido sulfúrico, tem valores de pKa negativos (-10 na primeira ionização). A estrutura da molécula do ácido carboxílico influencia grandemente a força ácida deste, de modo que ácidos substituídos, como o ácido triclororacético (pKa = 0,6), tem força ácida 15000 vezes maior que o ácido acético (pKa = 4,7). A força dos ácidos carboxílicos é determinada pelo efeito indutivo do radical ligado à carboxila (-COOH); radicais que atraem elétrons favorecem a ionização, ao passo que radicais doadores de elétrons desfavorecem a ionização (Allinger *et al.*, 1976). Desta forma, à medida que o número de átomos de carbono aumenta, por exemplo, ao passar do -H (ácido fórmico) para o radical -metil (ácido acético), a força ácida diminui, com os valores de pKa variando de 3,8 a 4,8. Todavia, à medida que a cadeia carbônica cresce linearmente, esta variação não se torna mais tão intensa; o pKa do ácido butírico (C4) é similar ao do ácido acético, 4,9 (Allinger *et al.*, 1976).

$$\text{Eq. 6} \quad pKa = -\log \frac{[HA]}{[H^+]}$$

Já para os álcoois, o caráter básico pode ser relacionado com os parâmetros da equação de Kamlet-Taft. O parâmetro β da equação de Kamlet-Taft mede a basicidade da ligação hidrogênio de um composto, a partir da determinação da energia do orbital molecular do qual a doação de carga pode ocorrer (Kamlet *et al.*, 1983; Kamlet e Taft, 1985; Waghorne,

2020). Álcoois monofuncionais vão se tornando mais básicos à medida que se aumenta o número de carbonos da cadeia principal (Kamlet *et al.*, 1983). Na mistura de ácidos e álcoois, por exemplo, a ionização do ácido é mais favorecida com álcoois menos básicos, como metanol, etanol, *n*-propanol e menos favorecida com álcoois superiores. Neste sentido, a síntese de ésteres de cadeia curta – oriunda da reação entre ácidos carboxílicos de cadeia curta, de relativa força ácida, e álcoois de cadeia curta, menos básicos – tende a representar um ambiente químico mais ácido do que a síntese de ésteres de cadeia média e longa. Este contexto também pode levar a um desfavorecimento termodinâmico da reação, já que apenas a forma não dissociada do ácido carboxílico contribui com a posição de equilíbrio da reação (Kütt *et al.*, 2018; Rosell *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2021b).

2.4 Aspectos ambientais e econômicos da reação de esterificação

A reação de esterificação é uma reação de neutralização na qual se forma um subproduto de baixa massa molar, a água. A formação de um subproduto inócuo e não tóxico como a água é um aspecto relevante do ponto de vista ambiental. A água formada, se apropriadamente separada e tratada, pode ser reaproveitada no processo como utilidade (para a geração de vapor e troca térmica, por exemplo) dependendo da viabilidade técnico-econômica de cada caso específico, reduzindo a pegada hídrica (Gupta *et al.*, 2012; Mehta, 2024). Para reforçar a vantagem ambiental da formação de água como subproduto em reações de esterificação, o chamado fator E, importante métrica ambiental de processos que calcula a quantidade de resíduo gerado por kg de produto produzido, é calculado descontando a água formada (Eq. 7) (Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014; Sheldon e Woodley, 2018), o que implicaria que processos de esterificação com rendimento próximo ao máximo teórico e razão molar próxima da equimolaridade tem fator E próximo de zero.

$$\text{Eq. 7} \quad \text{Fator } E = \frac{\sum m_{\text{resíduos}} - m_{\text{água}}}{m_{\text{produto}}}$$

A formação de água como subproduto na esterificação é um aspecto importante a ser considerado na comparação entre esterificação e transesterificação. A produção de ésteres por transesterificação tem o glicerol como subproduto. O glicerol é uma molécula de relevância comercial com variadas aplicações em produtos de higiene pessoal, cosméticos, perfumaria e produtos de limpeza (Kaur *et al.*, 2020). Contudo, com a crescente produção de biodiesel

(ésteres metílicos e etílicos de óleos vegetais), os níveis de produção de glicerol – em diferentes graus de pureza – aumentaram drasticamente. Em 2019, apenas no Brasil, foram gerados 819 mil toneladas (650 mil m³) de glicerina residual, sendo que 430 mil toneladas foram exportadas a um custo médio de 0,16 USD kg⁻¹, valor 6 vezes menor do que o praticado antes da implantação do Programa Nacional de Produção de Biodiesel (PNPB) (Faber, 2021). Este excedente tem alavancado tanto o interesse acadêmico pela utilização do glicerol como plataforma para outras sínteses (Chun Minh, Samudrala e Bhattacharya, 2022; Karimi Estahbanati *et al.*, 2020; Kaur *et al.*, 2020), a chamada gliceroquímica, bem como o estudo de novas técnicas para a purificação e reaproveitamento do glicerol (Attarbach, Kingsley e Spallina, 2023). Tendo isso em vista, o glicerol impuro passa a ser um subproduto pouco rentável ou passível de destinação onerosa, já que não pode ser descartado em corpos d'água sem o devido tratamento.

As condições severas em que as reações de esterificação ocorrem – altas temperaturas e com a presença de catalisadores tóxicos/corrosivos – trazem impactos ambientais significativos aos processos convencionais de obtenção de ésteres, incluindo emissões de gases de efeito estufa (alta energia requerida para aquecimento na reação e trocas térmicas em processos de purificação), necessidade de cuidadoso tratamento de efluentes e reposição freqüente de materiais em equipamentos sujeitos a corrosão (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Khan *et al.*, 2021; Moazeni, Chen e Zhang, 2019; Tabatabaei *et al.*, 2019; Thum e Oxenbøll, 2008). Considerando as tendências de busca por uma química mais verde e sustentável, os esforços globais para redução de emissões de carbono, e as movimentações regulatórias e ambientais em diversos países é intuitivo pensar que a produção de ésteres, bem como de outras *commodities* (produtos químicos de baixo custo, < 5 USD kg⁻¹, e grandes volumes de produção) e especialidades químicas (custo > 5 USD kg⁻¹), passará por importantes mudanças tecnológicas (Konzock e Nielsen, 2024; Kruis *et al.*, 2019; Sheldon, 2014; Straathof, 2014; Turton *et al.*, 2018; Woodley, 2019). A intensificação de tais mudanças vem sendo frequentemente discutida no âmbito do Fórum Econômico Mundial devido à sua importância econômica e vinculação direta com a descarbonização da economia e a adaptação às mudanças climáticas (DECHEMA AUSSTELLUNGS-GMBH, 2024; GÓMEZ; OXANA SAIMO; WORLD ECONOMIC FORUM, 2024).

A necessidade de excesso estequiométrico de um dos reagentes para deslocamento do equilíbrio da esterificação na direção da síntese também tem impacto na economia do processo, por três principais implicações: i) a produtividade volumétrica do processo cai, já que uma parte do volume útil do reator estará ocupado com uma porção do reagente que não

se converte em produto; ii) a necessidade de etapas adicionais de separação e recuperação do reagente em excesso; e iii) maior demanda por reagentes para início do processo. Essas três implicações podem acarretar custos de capital e de operação adicionais (Towler e Sinnott, 2013; Turton *et al.*, 2018). Desta forma, as razões molares ácido:álcool em esterificação devem ser cuidadosamente avaliadas para que o mínimo de excesso estequiométrico necessário para deslocamento do equilíbrio seja adotado (Kuperkar *et al.*, 2014; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021c; Towler e Sinnott, 2013). Geralmente, usa-se o excesso estequiométrico de álcoois para o deslocamento do equilíbrio devido à sua facilidade de separação do meio reacional por destilação (pontos de ebulição mais baixos que os ácidos) e, em alguns casos, por serem reagentes de menor custo que os ácidos carboxílicos (Allinger *et al.*, 1976).

A necessidade de catalisadores em reações de esterificação também traz implicações econômicas, considerando o custo do catalisador, a carga de catalisador utilizada e se há a possibilidade de recuperá-lo/reusá-lo após uma batelada de reação. Quando se trata de catalisadores homogêneos, como o já citado ácido sulfúrico, a recuperação do catalisador é onerosa; faz-se necessário uma etapa de neutralização/regeneração que pode gerar efluentes potencialmente perigosos, demandando tratamentos para o seu descarte no meio ambiente. Já com catalisadores heterogêneos, a separação e reciclo do catalisador tendem a ser mais simples, por operações como filtração e decantação, representando ampla vantagem da catálise heterogênea em relação a homogênea (Khan *et al.*, 2021; Richardson, 1989). A carga de catalisador, neste contexto, adquire especial importância em termos dos custos envolvidos no dimensionamento dos equipamentos para recuperação, que também podem demandar etapas de lavagem e secagem. A quantia de reusos do catalisador em seguidas bateladas, ou o número de horas em que permanece ativo em processos contínuos, é fundamental para a economicidade do processo, já que o catalisador, dependendo de sua composição, é frequentemente mais caro do que o produto obtido (Towler e Sinnott, 2013; Turton *et al.*, 2018).

A relação de custo entre catalisador e custo de produto é o que ainda sustenta, em grande parte, a utilização do ácido sulfúrico nos processos de produção dos ésteres, já que o ácido sulfúrico é uma *commodity* de baixo preço (em torno de 1 USD kg⁻¹) e ampla disponibilidade em termos mundiais. Apesar de sua comprovada eficiência catalítica, o ácido sulfúrico é extremamente corrosivo para a maioria dos metais e ligas metálicas (Khan *et al.*, 2021; Moazeni, Chen e Zhang, 2019; Tabatabaei *et al.*, 2019), afetando a vida útil dos

equipamentos industriais, traz riscos ocupacionais sérios para trabalhadores e residentes próximos das plantas industriais, bem como riscos ambientais severos em casos de acidentes.

Outra desvantagem do ácido sulfúrico como catalisador em reações de esterificação é a formação de subprodutos de reações paralelas, que demandam cuidadosa purificação do produto obtido. O ácido sulfúrico pode promover a desidratação dos álcoois em altas temperaturas, levando-os à éteres ou à alcenos, reações de eliminação com ácidos carboxílicos formando anidridos orgânicos, e também catalisar a oligomerização dos ácidos orgânicos ou dos ésteres formados (Loterio *et al.*, 2005).

2.5 Biocatálise aplicada à síntese de ésteres

Uma das principais desvantagens da catálise por ácido sulfúrico/clorídrico em reações de esterificação – a formação de subprodutos de reações paralelas (baixa seletividade), levando a ésteres de baixa pureza – pode ser superada utilizando-se lipases, biocatalisadores de origem biológica com especificidade e seletividade superiores aos catalisadores convencionais. Lipases são enzimas – um tipo especial de proteínas com função catalítica nos organismos vivos – cuja função natural é catalisar a hidrólise de lipídios até ácidos graxos, que poderão servir tanto para o catabolismo (geração de energia) quanto para o anabolismo (formação de macromoléculas e constituintes de organelas celulares e tecidos) (Kapoor e Gupta, 2012; Nelson e Cox, 2004). Quando isoladas de microrganismos (bactérias, fungos, leveduras) ou tecidos vegetais e animais, as enzimas mantêm sua atividade catalítica e podem ser utilizadas em reações de interesse industrial, constituindo-se como biocatalisadores (Chandra *et al.*, 2020; Kruis *et al.*, 2019). Em um meio com baixa concentração de água, as lipases catalisam reações de esterificação/transesterificação com grande eficiência, sem formação de subprodutos (Adlercreutz, 2013; Hari Krishna e Karanth, 2002; Kapoor e Gupta, 2012). Assim, a produção de ésteres pode ser facilitada utilizando-se biocatálise, já que se obtém um éster com mínima concentração de contaminantes após a reação (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013). Esta especificidade catalítica pode gerar uma simplificação de etapas de processo para purificação do produto e, por consequência, reduzir custos operacionais e de investimento nas plantas de produção, conforme mostrado simplificadaamente na Figura 3.

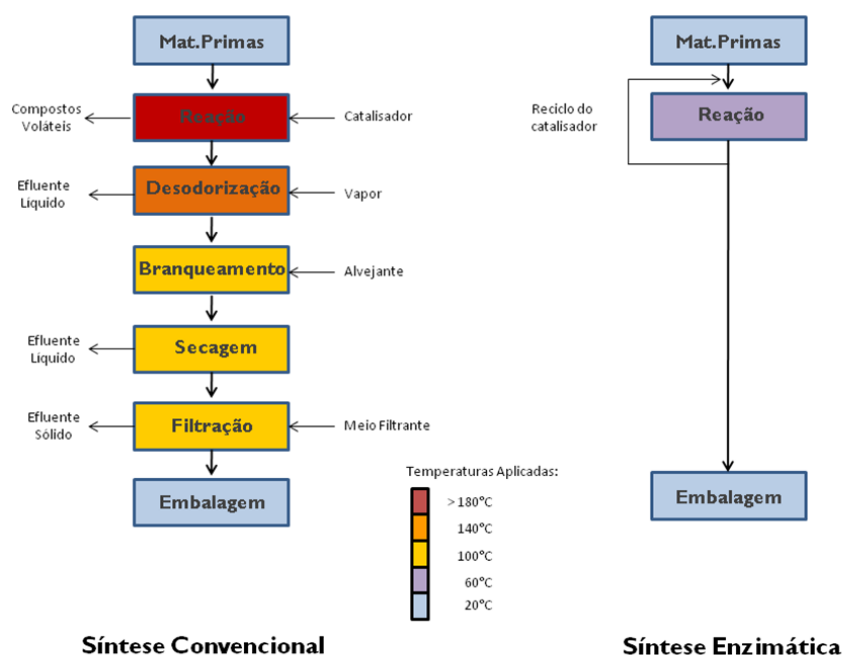


Figura 3: Comparação das etapas de processo de obtenção e purificação de ésteres pela via química e pela via enzimática.

Fonte: Adaptado de Ansorge-Schumacher e Thum, 2013

Como as lipases são enzimas que atuam em organismos vivos e, estes, de modo geral estão em condições ambiente de temperatura e pressão, a atividade catalítica dos biocatalisadores se dá em condições brandas, bem abaixo das usualmente adotadas em reações de esterificação com catalisadores químicos (em torno de 150 – 200 °C). A literatura científica em síntese enzimática de ésteres, em sua maioria, descreve altos rendimentos em ésteres em temperaturas de 40 a 70 °C (Coelho e Orlandelli, 2020; Khan e Rathod, 2015; Sá *et al.*, 2017; Sousa *et al.*, 2021c). Temperaturas brandas como estas representam menor demanda energética no processo, minimizam o risco de reações paralelas, aumentam a vida útil de equipamentos de processo, aumentam a segurança ocupacional das plantas industriais para trabalhadores e comunidades do entorno e reduzem a severidade dos danos em caso de acidentes. Estas vantagens estão em plena consonância com vários dos princípios da Química Verde compilados por Anastas & Eghbali (2010) (Anastas e Eghbali, 2010), conforme também apontado nos trabalhos de Sheldon & Woodley (2018) (Sheldon e Woodley, 2018) e Serrano-Arnaldos e co-autores (2020) (Serrano-Arnaldos *et al.*, 2020).

As lipases podem ser utilizadas como biocatalisadores em duas formas – livre (em solução ou liofilizada) ou imobilizada em um suporte sólido. Em uma reação de esterificação

em meio líquido, como usualmente ocorre, uma lipase em solução constitui-se como um catalisador homogêneo e uma lipase imobilizada como um catalisador heterogêneo. Dentre as lipases mais estudadas, destacam-se as lipases obtidas da levedura *Candida antarctica* e do fungo mezofílico *Rhizomucor miehei*. Os artigos de revisão de Ortiz e co-autores (2019) (Ortiz *et al.*, 2019), Khan & Rathod (2015) (Khan e Rathod, 2015) e Rodrigues & Fernandez-Lafuente (2010) (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010) mencionam dezenas de aplicações destas lipases nas sínteses de ésteres, tanto na forma livre como na forma imobilizada. Uma análise bibliométrica conduzida por Dutra e co-autores (2022) (Dutra *et al.*, 2022) revelou que, na síntese enzimática de biodiesel, a lipase B de *Candida antarctica* é a mais amplamente estudada, correspondendo a 55% dos 1480 estudos avaliados entre 1998 e 2020; os estudos envolvendo a lipase de *Rhizomucor miehei* correspondem a 13% deste total.

Lipases, tanto em forma livre como em forma imobilizada, estão disponíveis comercialmente para aplicações industriais. Dentre os maiores fabricantes de lipases estão empresas como Novozymes (Dinamarca), DuPont (EUA), DSM (Holanda), Megazyme (Irlanda) e Amano (Japão). As lipases comerciais mais descritas na literatura para síntese de ésteres são as produzidas pela Novozymes A/S – Novozym 435, Lipozyme RM IM, Lipozyme TL-IM e Eversa Transform 2.0 (Dutra *et al.*, 2022; Ortega-Requena *et al.*, 2024; Ortiz *et al.*, 2019). Ainda que as reações de esterificação/transesterificação sejam uma das aplicações mais óbvias para lipases, há poucos processos industriais implementados para síntese de ésteres por biocatálise. Dentre eles, a produção de ésteres de cadeia longa para fins cosméticos pela Evonik (Alemanha), os processos da Eastman (EUA) e alguns poucos exemplos de produção de biodiesel por via enzimática.

O principal obstáculo para a ampla adoção da biocatálise neste campo é o custo (elevado) dos biocatalisadores em comparação ao valor agregado relativamente baixo da maioria dos ésteres alifáticos produzidos em larga escala (Sheldon, 2014; Sousa *et al.*, 2023; Woodley, 2019), fato amplamente apresentado pela literatura científica (Girelli, Astolfi e Scuto, 2020; Junior *et al.*, 2022; Nielsen, Brask e Fjerbaek, 2008; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2023a). Todavia, grandes companhias químicas detêm patentes de processos biocatalíticos para a síntese de ésteres, como é o caso da Basf AG (Alemanha), Buckman Chemicals (EUA), Fuji Oil (Japão), Samsung Fine Chemicals (Coréia do Sul) e Hoechst AG (Alemanha) ou da própria Novozymes A/S (Dinamarca), um dos maiores produtores mundiais de enzimas (“OMPI – Pesquisa nas coleções internacionais e nacionais de patentes”, [s.d.]). As aplicações industriais mais relevantes das lipases são a formulação de detergentes e de produtos de limpeza, já que as lipases podem catalisar a hidrólise de gordura

(triacilglicerídeos) facilitando os processos de limpeza de tecidos e superfícies (“OMPI – Pesquisa nas coleções internacionais e nacionais de patentes”, [s.d.]).

2.6 Lipases – características, propriedades e fontes de obtenção

Lipases constituem uma classe especial de enzimas hidrolíticas, com a classificação EC 3.1.1.3 (triacilglicerol hidrolases) de acordo com a classificação dada pela União Internacional dos Bioquímicos (IUB). De modo geral, são enzimas que possuem estrutura composta de um núcleo de fitas β predominantemente paralelas rodeada de α -hélices (Kapoor e Gupta, 2012; Ollis *et al.*, 1992; Schrag *et al.*, 1997). Lipases tem tamanhos variados, entre 20 e 60 KDa (Yahya *et al.*, 1998), e tem como peculiaridade a presença de uma cadeia polipeptídica recobrindo o sítio ativo, chamada de “tampa” (Anobom *et al.*, 2014; Fernandez-Lafuente, 2010; Kapoor e Gupta, 2012; Malcata *et al.*, 1992; Paiva, Balcão e Malcata, 2000). Conforme classificação proposta por Pleiss e co-autores (1998) a respeito da estrutura das lipases, três subgrupos podem ser identificados: as lipases que possuem um sítio de ligação hidrofóbico próximo da superfície proteica, similar a uma fenda; as lipases com um sítio de ligação similar a um funil e; as lipases com um sítio de ligação em formato de túnel (Kapoor e Gupta, 2012; Pleiss, Fischer e Schmid, 1998).

As lipases são produzidas na natureza majoritariamente nas células mamárias, nas plantas e nos microrganismos (Malcata *et al.*, 1992; Yahya *et al.*, 1998). A obtenção de lipases para usos em pesquisas e/ou aplicações comerciais é, na maior parte de casos, de origem microbiana (Robinson, 2015), com maior destaque para as lipases oriundas de fungos e leveduras. As lipases microbianas tem como vantagem o fato de não precisarem de coenzimas para sua atividade catalítica (Adlercreutz, 2013). Dentre a grande variedade de fungos produtores de lipases descritas na literatura, destacam-se as lipases dos fungos *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizopus oryzae*, da bactéria *Burkholderia cepacia*, e das leveduras *Candida antarctica* e *Candida rugosa*.

A função natural das lipases é catalisar a hidrólise das ligações ésteres em triglicerídeos, levando-os a formas menos hidrofóbicas – diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos e ácidos graxos (Adlercreutz, 2013). A atividade catalítica das lipases deve-se à ação da tríade catalítica serina-histidina-aspartato/glutamato (Anobom *et al.*, 2014; Noble *et al.*, 1993; Yahya *et al.*, 1998). A reação de hidrólise se dá pelo ataque nucleófilo da serina sobre a carbonila da ligação éster (doador de acila), liberando um álcool; o acil-

intermediário formado reage então com a água, liberando o ácido carboxílico (Adlercreutz, 2013; Gandhi *et al.*, 2000). Como muitos compostos podem atuar como doadores de acila (incluído os ácidos carboxílicos) e como nucleófilos (incluindo os álcoois), as lipases possuem ampla especificidade ao substrato; em meios orgânicos com baixa concentração de água, as lipases passam então a catalisar reações de esterificação e transesterificação (Adlercreutz, 2013; Rangheard, Triantaphylides e Baratti, 1989). Neste caso, um intermediário tetraédrico é formado pelo ataque nucleófilo da serina da tríade catalítica sob o ácido carboxílico; este intermediário perde água e forma o complexo acil-enzima, que sofre um ataque nucleófilo pelo álcool e forma um novo intermediário tetraédrico. Este, finalmente, libera a molécula do éster e a enzima em sua forma nativa (Anobom *et al.*, 2014; Gandhi *et al.*, 2000). Cineticamente, a esterificação por lipases é descrita pelo mecanismo do tipo Ping-Pong bi-bi reversível (Chulalaksananukul *et al.*, 1990; Gandhi *et al.*, 2000; Hari Krishna e Karanth, 2002), em decorrência da aplicação do modelo de Michaelis-Menten, que se mostra válido para a maioria das reações enzimáticas (Figura 4)

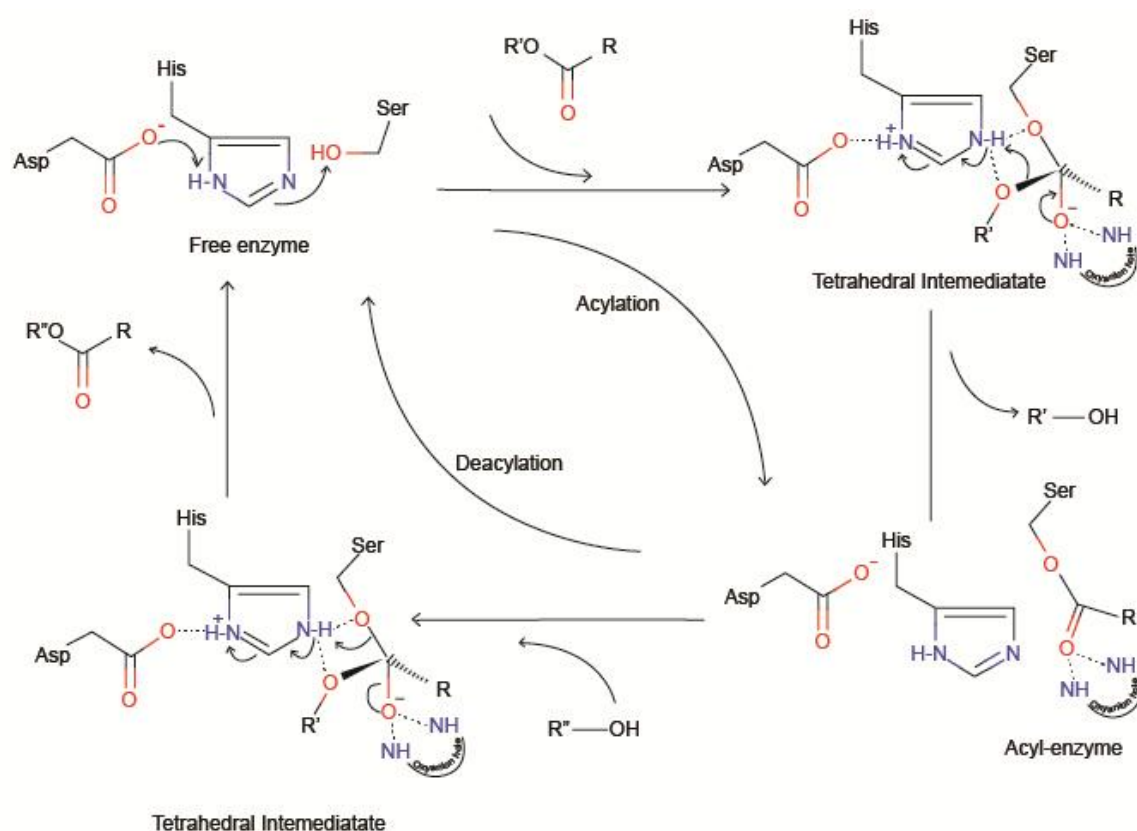


Figura 4: Mecanismo de atuação da tríade catalítica das lipases.

Fonte: Adaptado de Castillo *et al.*, 2015.

As lipases podem sofrer inibição pelos substratos. A inibição geralmente observada em lipases é uma inibição do tipo competitiva, na qual um substrato de estrutura similar ao substrato esperado em determinado passo do mecanismo da reação se liga ao sítio ativo da enzima (Nelson e Cox, 2004; Robinson, 2015), resultando em uma redução (reversível) da atividade catalítica. Diversos estudos na literatura atestam este fato experimentalmente, identificando inibições tanto pelo álcool (Chulalaksananukul *et al.*, 1990; García-Alles e Gotor, 1998; Garcia, T. *et al.*, 1999; Ghamgui, Karra-Chaabouni e Gargouri, 2004; Sandoval *et al.*, 2002; Yadav e Thorat, 2012) quanto pelo ácido carboxílico (Bélafi-Bakó *et al.*, 2003; Hari Krishna, Sattur e Karanth, 2001; Nordblad e Adlercreutz, 2008; Parikh, Lanjekar e Rathod, 2019), ou simultaneamente pelo ácido e pelo álcool (Lopresto *et al.*, 2014; Sousa, *et al.*, 2021c). Álcoois de cadeia curta, como o metanol e o etanol, tem forte efeito denaturante e podem levar as lipases à inativação, dependendo da concentração (Mangiagalli *et al.*, 2022). Álcoois de cadeia curta podem causar o desdobramento parcial da estrutura proteica das lipases, pelo rompimento de interação hidrofóbicas intra-proteicas (Gandhi *et al.*, 2000; Lotti *et al.*, 2015)

Assim como a inibição enzimática pelos substratos pode reduzir a atividade catalítica das lipases, alterações na camada de hidratação que rodeia as lipases também podem promover restrições cinéticas. A existência de uma camada de água ao redor das proteínas vem sendo apontada desde os anos 1950 e confirmada experimentalmente ao longo das décadas seguintes por diferentes técnicas analíticas (Rupley e Careri, 1991). De acordo com os estudos de Zaks & Klivanov sobre enzimologia em meios não-aquosos (Zaks e Klivanov, 1985, 1988), a camada de água que envolve as enzimas atua como uma espécie de “lubrificante”, favorecendo alterações conformacionais, incluindo as que são necessárias para a atividade catalítica. Desta forma, a interação de um solvente ou um meio reacional com esta camada de água tem grande impacto na atividade catalítica da enzima (lipase, nesse caso específico); um solvente (ou meio reacional) hidrofílico tende a remover esta camada, ao passo que um solvente hidrofóbico tende a preservá-la, o que justifica o melhor desempenho (maior atividade enzimática) das lipases em meios hidrofóbicos do que em meios hidrofílicos (Bezbradica *et al.*, 2007; Hari Krishna *et al.*, 2001; Klivanov, 2001; Malcata *et al.*, 1992; Yahya *et al.*, 1998). Apesar das lipases naturalmente atuarem em meios aquosos, a restrição de água ocasionada na presença de solventes hidrofóbicos anidros torna a estrutura enzimática menos flexível e menos propensa à denaturação, fenômeno que também exige alterações conformacionais intensas (Klivanov, 2001). Considerando a variedade de lipases microbianas,

o ponto ótimo de hidratação do meio reacional (associado à magnitude da camada de hidratação) varia amplamente para cada lipase – enquanto a lipase de *Burkholderia cepacia* tem seu ótimo de hidratação em alta atividade termodinâmica de água, a lipase B de *Candida antarctica* tem seu ótimo em atividade termodinâmica de água próxima a zero (Adlercreutz, 2013).

O pH ótimo de atuação das lipases é bastante variável, oscilando entre 5,0 e 8,0 para lipases de origem microbiana, podendo se deslocar mais para a região ácida dependendo do meio reacional, da presença de sais e/ou substâncias emulsificantes (Hari Krishna e Karanth, 2002; Malcata *et al.*, 1992; Stergiou *et al.*, 2013). O pH pode gerar protonação nos aminoácidos que integram o sítio ativo das enzimas, alterando sua atividade catalítica; variações extremas de pH podem alterar drasticamente as interações intra-estruturais da proteína, levando à alterações conformacionais na estrutura tridimensional desta (Robinson, 2015). A lipase B de *Candida antarctica* tem pH ótimo em 7,0, mas mantém sua estabilidade catalítica em uma faixa mais ampla de pH, de 3,5 a 9,5 (Tassel, Moilanen e Ruddock, 2020); já a lipase de *Rhizomucor miehei* tem pH ótimo entre 6,8 e 7,4 (Takó *et al.*, 2017) e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* tem pH ótimo 6,5 (Ogundero, 1987).

Embora a literatura científica dê destaque à versatilidade das lipases e sua capacidade de catalisar reações com uma ampla variedade de substratos (comportamento descrito por alguns autores como “promiscuidade catalítica”) (Kapoor e Gupta, 2012), há diferenças significativas na preferência das diferentes lipases pelos diferentes substratos. A capacidade de converter diferentes substratos pode ter relação com a necessidade fisiológica dos organismos de hidrolisar triglicerídeos (ou seus derivados) com grande variedade de ácidos graxos em sua composição (Rodrigues *et al.*, 2019). A seletividade é, basicamente, uma preferência da enzima em prol de um substrato dentre diversos substratos que competem pelo sítio ativo (Rangheard, Triantaphylides e Baratti, 1989). Essas preferências estão relacionadas ao grupo funcional e a reação que é catalisada (quimioseletividade), ao tamanho do substrato (tiposeletividade), a posição do grupo funcional no caso da hidrólise dos triglicerídeos (regioseletividade, posição *sn*-1 ou *sn*-3) e a posição espacial de diferentes isômeros em uma mistura racêmica (enantioseletividade). Dentre estas, a tiposeletividade é de particular interesse quando se trabalha com matrizes complexas, como misturas de ácidos e álcoois de diferentes tamanhos de cadeia em reações de esterificação. Os substratos naturais das lipases são os triglicerídeos e os ácidos de cadeia longa (Park e Park, 2022; Yahya *et al.*, 1998), já que triglicerídeos de cadeia curta não são tão frequentes na natureza, sendo a gordura do leite e alguns óleos de plantas notáveis exceções (Fleta, 2010; Schönfeld e Wojtczak, 2016). Neste

sentido, a literatura descreve a tiposeletividade de várias lipases por ácidos graxos e álcoois de cadeia média e longa (Fernandez-Lafuente, 2010; Gandhi, Sawant e Joshi, 1995; Kapoor e Gupta, 2012; Kirk *et al.*, 1992; Laudani, Giovanna e Porta, 2006; Lee e Parkin, 2001; Park e Park, 2022; Shin e Seo, 2023). Apesar de uma grande variedade de substratos serem capazes de se ligar ao sítio ativo das lipases, apenas alguns destes substratos promovem a energia de ligação apropriada para as alterações conformacionais necessárias à catálise, como é o caso dos substratos de cadeia curta e pouco insaturados (Malcata *et al.*, 1992). Uma parte desta energia de ligação é também utilizada para ajustar a conformação do próprio substrato em relação ao sítio ativo, de acordo com a teoria do ajuste induzido (Koshland, 1958; Peters e Bywater, 1999). Alguns trabalhos na literatura descrevem esforços para incrementar a tiposeletividade de lipases em relação a substratos de cadeia curta por meio de técnicas de biologia sintética (Quaglia *et al.*, 2019; Schmitt *et al.*, 2002; Shin e Seo, 2023).

Para o estudo da tiposeletividade das lipases geralmente se adotam misturas de diversos substratos em um meio reacional, para avaliar quais substratos serão preferencialmente convertidos ao longo de um determinado tempo. Essas misturas são chamadas de sistemas multicompetitivos, nos quais diferentes substratos “competem” pelo sítio ativo da enzima. Estudos desse tipo foram desenvolvidos nos anos 1980, com as definições conceituais e matemáticas dos fatores de competição em lipases nos trabalhos de Chen e co-autores (1982) (Chen *et al.*, 1982), Deleuze e co-autores (1987) (Deleuze *et al.*, 1987) e Rangheard e co-autores (1989) (Rangheard, Triantaphylides e Baratti, 1989), com estudos relevantes realizados pelo grupo de pesquisa de Parkin e co-autores (Arsan e Parkin, 2000a; Arsan e Parkin, 2000b; Fu e Parkin, 2004; Kuo e Parkin, 1996; Lee e Parkin, 2001, 2000). Estes estudos discutem que a seletividade das lipases por um determinado substrato é influenciada tanto por fatores intrínsecos (estrutura proteica, sítio ativo, dentre outros) quanto por fatores extrínsecos (atividade de água do meio reacional, natureza do solvente ou meio reacional, dentre outros). As taxas reacionais relativas de um substrato em relação a um substrato de referência dão o parâmetro para a tiposeletividade da lipase, conforme mostrado na Eq. 8 (Berger e Schneider, 1991; Fu e Parkin, 2004; Park e Park, 2022), em que o substrato A é considerado o substrato de referência e B o substrato competitivo. Os valores de α determinam o progresso da reatividade de cada substrato competitivo em relação ao de referência, sendo a inclinação da curva em um gráfico log-log desta equação para cada par de substratos. Na Eq. 8, C_0 é a concentração inicial e C_x a concentração em um determinado intervalo de tempo. Assim, um valor α acima de 1 para qualquer substrato competitivo indica

maior seletividade da lipase por este substrato do que para o substrato de referência (Fu e Parkin, 2004).

$$\text{Eq. 8} \quad \log\left(\frac{c_0}{[c_0 - c_x]}\right)_A = \alpha \log\left(\frac{c_0}{[c_0 - c_x]}\right)_B$$

Uma característica marcante da maioria das lipases é a presença de uma região flexível que recobre o sítio ativo, similar a uma tampa; a face voltada para o sítio é composta de cadeias hidrofóbicas, enquanto a face voltada para o meio é hidrofílica, estabilizada por interações com a superfície da proteína (Gandhi *et al.*, 2000; Malcata *et al.*, 1992; Uppenberg *et al.*, 1994; Yahya *et al.*, 1998). Estudos cristalográficos realizados a partir dos anos 1990 demonstram as formas “aberta” e “fechada” de diversas lipases (Anobom *et al.*, 2014; Hari Krishna e Karanth, 2002; Uppenberg *et al.*, 1994). Outra peculiaridade comum a várias lipases é a sua alta capacidade de atuar em interfaces orgânico-aquosas, já que nos organismos vivos as lipases estão em meio aquoso e seus substratos naturais (triglicerídeos) são insolúveis em água (Adlercreutz, 2013). Este fenômeno é chamado de ativação interfacial, e a hipótese mais aceita é a de que a ativação se dá justamente pelas alterações conformacionais relacionadas à movimentação da tampa, que expõe o sítio ativo da enzima (forma “aberta”), permitindo o acesso do substrato (Adlercreutz, 2013; Gandhi *et al.*, 2000; Hari Krishna e Karanth, 2002; Verger, 1997; Yahya *et al.*, 1998). Essa propriedade é utilizada como estratégia de imobilização e hiperativação, já que é possível hiperexpor o sítio ativo da lipase, favorecendo a forma “aberta” e imobilizá-la neste estado de hiperativação, particularmente em suportes hidrofóbicos (Fernandez-Lafuente *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 2013; Verger, 1997). Desta forma, a imobilização pode contribuir decisivamente para incrementar a atividade catalítica das lipases em favor de aplicações sintéticas (Adlercreutz, 2013; Rodrigues *et al.*, 2013; Sheldon, 2007).

2.7 Lipases imobilizadas – características, vantagens e desvantagens

A imobilização consiste no confinamento das enzimas em um determinado espaço, com o propósito de recuperá-las e reutilizá-las após uma determinada reação (Adlercreutz, 2013; Bolivar, Woodley e Fernandez-Lafuente, 2022; Sheldon e Pelt, van, 2013). Na forma imobilizada, as lipases constituem-se como um catalisador heterogêneo para a síntese de

ésteres, com as já citadas vantagens de fácil separação e recuperação do meio líquido para reuso. Além disso, a imobilização de enzimas pode trazer importantes benefícios – aumento da estabilidade operacional, aumento da atividade catalítica por uma superexposição do sítio ativo na conformação mais apropriada para a catálise, redução da possibilidade de contaminação do catalisador pelo meio, facilidade de manuseio e redução de potencial alergênico para quem manuseia, já que um biocatalisador imobilizado terá maior dificuldade em penetrar a pele do que um biocatalisador líquido (Adlercreutz, 2013; Sheldon e Pelt, van, 2013). Em alguns casos, a imobilização de enzimas é não apenas vantajosa, como indispensável para catalisar certas reações diferentes das funções naturais de uma dada enzima com determinados substratos e em certas condições reacionais (Bolivar, Woodley e Fernandez-Lafuente, 2022).

A imobilização de lipases é um tema amplamente estudado na literatura científica, como atestam os vastos artigos de revisão e livros disponíveis sobre o tema (Adlercreutz, 2013; Bolivar, Woodley e Fernandez-Lafuente, 2022; Datta, Christena e Rajaram, 2013; Filho, Silva e Guidini, 2019; Garcia-Galan *et al.*, 2011; Girelli, Astolfi e Scuto, 2020; Rodrigues *et al.*, 2019; Sheldon, 2007; Sheldon e Pelt, van, 2013; Shuai *et al.*, 2017). Um dos primeiros relatos sobre o tema é o trabalho de Nelson & Griffin em 1916, que observaram a adsorção de uma invertase na superfície de alguns materiais sólidos (Nelson e Griffin, 1916; Zucca, Fernandez-Lafuente e Sanjust, 2016). A imobilização pode ser feita por diferentes técnicas – adsorção, encapsulação, confinamento, ligação covalente, reticulação cruzada (*crosslinking*) – utilizando uma grande variedade de materiais. Os suportes de imobilização podem ser divididos em três grandes grupos de materiais – inorgânicos, orgânicos naturais e orgânicos sintéticos (Adlercreutz, 2013; Datta, Christena e Rajaram, 2013; Filho, Silva e Guidini, 2019; Girelli, Astolfi e Scuto, 2020; Patti *et al.*, 2024). Os diferentes materiais e técnicas podem ser utilizados para incrementar as propriedades das lipases, quer seja aumentar sua atividade catalítica em um determinado meio reacional, melhorar sua estabilidade, favorecer a transferência de massa de substratos e produtos, favorecer a separação pós-reação, dentre outros aspectos. Todavia, quanto mais sofisticado o material e o método de imobilização, maior o impacto do custo da imobilização no custo do biocatalisador, sendo necessária uma adequada análise de custo-benefício (Bolivar, Woodley e Fernandez-Lafuente, 2022; Tufvesson *et al.*, 2011a; Tufvesson *et al.*, 2011b; Woodley, 2019).

A comparação entre estudos de imobilização de lipases evidencia as diferenças entre materiais e técnicas no que tange o impacto destas no custo do biocatalisador. O trabalho de Cipolatti e co-autores (Cipolatti *et al.*, 2018) imobilizou a lipase B de *Candida antarctica* em suportes de polimetilmetacrilato pela técnica de adsorção. Já o trabalho de Bayramoglu e co-autores (Bayramoğlu *et al.*, 2011), imobilizou a lipase de *Candida rugosa* em membrana funcionalizada de polipropileno aminado pela técnica de ligações covalentes. O primeiro trabalho adotou em seu protocolo de imobilização apenas 3 reagentes (incluindo o próprio material do suporte) em única etapa; já o segundo trabalho utilizou 5 reagentes, além do material do suporte e sua preparação, e 3 etapas em seu protocolo de imobilização. Assim, é intuitivo pensar que o método de imobilização por ligações covalentes tende a ser mais caro e demandar mais tempo do que a imobilização por adsorção, mesmo levando em conta a limitação de uma única comparação entre estudos de imobilização. A técnica de adsorção é amplamente descrita na literatura como uma metodologia simples, escalável e relativamente barata para imobilização de enzimas (Adlercreutz, 2013; Filho, Silva e Guidini, 2019; Shuai *et al.*, 2017). A adsorção consiste basicamente no contato da enzima com a superfície do material adsorvente, que se ligam através de interações fracas, como as forças de Van der Waals (Adlercreutz, 2013; Filho, Silva e Guidini, 2019). A adsorção é o método utilizado para imobilização de alguns dos biocatalisadores comerciais mais estudados – Lipozyme TL IM, Lipozyme RM IM e Novozym 435 (Fernandez-Lafuente, 2010; Ishak e Lajis, 2018; Ortiz *et al.*, 2019; Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010).

O trabalho de Tufvesson e co-autores (Tufvesson *et al.*, 2011b) traz informações sobre o custo de suportes de imobilização frequentemente utilizados em estudos na literatura – as resinas comerciais Amberlite, Duolite, Accurel e Lewatit – com custos que variam de 40 a 90 euros kg⁻¹, em estimativas da época. Os custos destes suportes de imobilização (sem incluir os custos da própria lipase purificada em si) superam amplamente os valores de venda da maioria dos ésteres alifáticos (sem levar em conta a carga de lipase imobilizada utilizada em um dado processo), reforçando a magnitude do desafio econômico para viabilizar a biocatálise na produção de *commodities* e especialidades químicas (Tufvesson *et al.*, 2011b; Woodley, 2022). Para ilustrar a variedade de materiais utilizados para imobilização de lipases e as propriedades gerais das diferentes classes de materiais de suporte, a Tabela 6 mostra alguns exemplos descritos na literatura.

Tabela 6: Tipos de suporte de imobilização para lipases, características gerais e exemplos de aplicação para lipases comumente estudados.

| | Tipo de suporte de imobilização | | |
|--|--|--|--|
| | Inorgânicos | Orgânicos Naturais | Orgânicos Sintéticos |
| Características gerais | Resistência mecânica, alta área superficial, resistência a pH e temperaturas extremas; suscetível a inativação | Biodegradabilidade e biocompatibilidade; propriedades físico-químicas muito variáveis | Superfície química controlada; propriedades estruturais manipuláveis; alto custo |
| Lipase B de <i>Candida antarctica</i> | Imobilizada por ligações covalentes em alumina e sílica. Testada na esterificação do (r,s)-ibuprofeno (Arroyo, Sánchez-Montero e Sinisterra, 1999) | Imobilizada por adsorção em leitos de octil-agarose. Testada na hidrólise da triacetina. (Arana-Peña <i>et al.</i> , 2019) | Imobilizada por adsorção em estireno-divinilbenzeno. Testada na síntese do acetato de butila em <i>n</i> -hexano. (Graebin <i>et al.</i> , 2012) |
| Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> | Imobilizada por adsorção em montmorilonita. Testada na hidrólise da <i>p</i> -nitrofenil palmitato. (Babavatan <i>et al.</i> , 2020) | Imobilizada por adsorção em leitos de octil-agarose com crosslink físico. Testes de estabilidade em presença de surfactantes, altas temperaturas e solventes. (Fernandez-Lopez <i>et al.</i> , 2017) | Imobilizada por ligações covalentes em nanopartículas magnéticas. Testada em reações de transesterificação para obtenção de ésteres etílicos do óleo de babaçu. (Moreira <i>et al.</i> , 2020) |
| Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> | Imobilizada por adsorção em sílica. Testada na síntese do salicilato de metila em DMSO. (Kumar <i>et al.</i> , 2013) | Imobilizada por adsorção em casca de arroz. Testada na síntese do laurato de hexila em meio sem solvente. (Lira <i>et al.</i> , 2021) | Imobilizada por adsorção em poli-metaacrilato mesoporoso. Testada na síntese do butirato de isoamila em heptano. (Toderó <i>et al.</i> , 2015) |

Fonte: Adaptado de Patti *et al.*, 2014.

Tanto a técnica de imobilização quanto o material de imobilização podem alterar drasticamente as propriedades de uma enzima. O trabalho de Persson e co-autores (2002), por

exemplo, estudou diferentes tipos de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* e comparou-os com a enzima livre também em diferentes formas, obtendo resultados muito diferentes de atividade em cada um deles, conforme mostrado na Tabela 7 (Persson *et al.*, 2002). Já o trabalho de revisão de Ortiz e co-autores (2019) (Ortiz *et al.*, 2019) destaca que as propriedades da lipase B de *Candida antarctica* variam muito com os diferentes suportes e técnicas de imobilização. O artigo de revisão de Rodrigues e co-autores (2013) (Rodrigues *et al.*, 2013) lista algumas das principais modificações que podem vir a ser obtidas com a imobilização de lipases, dispostas na Tabela 8.

Tabela 7: Variação da atividade catalítica de esterificação da lipase de *Thermomyces lanuginosus* em reações de esterificação do ácido hexanóico com 1-fenil-etanol em *n*-hexano.

| Método de preparação | Atividade catalítica relativa |
|--|-------------------------------|
| Lipase sem modificação (livre, não imobilizada) | 0,25 |
| Lipase liofilizada | 1,1 |
| Lipase livre revestida com surfactante (aerosol AOT) | 2,1 |
| Lipase liofilizada (éter) | 10 |
| Lipase livre revestida com surfactante (Span 65) | 10 |
| Lipase liofilizada (KCl) | 11 |
| Lipase livre revestida com surfactante (Span 60) | 38 |
| Lipase imobilizada por confinamento em sol-gel | 79 |
| Lipase imobilizada por adsorção em polipropileno | 100 |

Fonte: Adlercreutz, 2013; Persson *et al.*, 2002.

Tabela 8: Modificação das propriedades das enzimas potencialmente obtidas pela imobilização.

| Efeito causado | Justificativa |
|---|--|
| Prevenção/redução da inibição enzimática | Em alguns casos, pode haver modificações estruturais em sítios onde a inibição usualmente ocorre sem interferência no sítio ativo. |
| Aumento/manutenção da atividade em condições severas | Efeitos protetivos (químicos ou mecânicos) trazidos pelo suporte de imobilização, a depender de sua composição, nas enzimas |
| Aumento da estabilidade estrutural | Na forma imobilizada, as enzimas tem maior “rigidez”, ficando menos suscetíveis a alterações que afetem sua atividade catalítica |
| Particionamento de reagentes/produtos no meio reacional | O suporte de imobilização pode ter natureza hidrofílica ou hidrofóbica, interagindo com o meio e alterando as características das diferentes fases do meio reacional |

Fonte: Rodrigues *et al.*, 2013

A natureza do suporte de imobilização é fundamental para as propriedades finais do biocatalisador imobilizado, sendo este uma resultante das propriedades da lipase em si com as propriedades do suporte de imobilização. Um material para suporte de imobilização de enzimas deve atender, preferencialmente, alguns critérios – ser um material quimicamente inerte, estável (quimicamente e microbiologicamente), ter alta área superficial, alta porosidade, ter adequado tamanho de partícula para a aplicação e ter resistência mecânica compatível com a aplicação pretendida (Adlercreutz, 2013; Zucca, Fernandez-Lafuente e Sanjust, 2016) – além de outros atributos relacionados a custo e facilidade de obtenção. Como as lipases livres são instáveis em meios hidrofóbicos, suportes de natureza hidrofílica podem ser, à primeira vista, a alternativa efetiva para a imobilização das lipases (Zucca, Fernandez-Lafuente e Sanjust, 2016). Amido e celulose, por exemplo, são suportes hidrofílicos amplamente disponíveis e de baixo custo, mas apresentam sérios problemas nestas aplicações:

o amido é suscetível à degradação microbiana, e apresenta baixa resistência mecânica; já a celulose é um material de baixa porosidade, demandando tratamentos adicionais para preparo da superfície e utilização em imobilização (Zucca, Fernandez-Lafuente e Sanjust, 2016). Suportes de sílica mesoporosa também já foram estudados para imobilização de lipases, bem como outros materiais relativamente hidrofílicos (Adlercreutz, 2013; Foresti *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2008; Mendes *et al.*, 2012; Oliveira, Pereira e Santos, 2022; Oliveira, de *et al.*, 2019). Contudo, um dos protocolos mais usuais é a imobilização utilizando suportes hidrofóbicos, valendo-se da propriedade da ativação interfacial, já que a tampa das lipases é hidrofóbica e esta, quando na conformação aberta, adsorve-se facilmente à materiais hidrofóbicos (Rodrigues *et al.*, 2019). Muitos trabalhos na literatura se dedicam ao tema da imobilização por ativação interfacial (Arana-Peña *et al.*, 2021; Fernandez-Lorente *et al.*, 2011; Manoel *et al.*, 2015; Reetz, Zonta e Simpelkamp, 1996; Virgen-Ortíz *et al.*, 2017) (Tacias-Pascacio *et al.*, 2017). Além disso, suportes hidrofóbicos para imobilizar lipases podem minimizar a ocorrência indesejada do acúmulo de água/glicerol nos suportes hidrofílicos em reações de esterificação/transesterificação (Rodrigues *et al.*, 2019; Tacias-Pascacio *et al.*, 2017). Este acúmulo pode levar a limitações de transferência de massa quando a reação envolve reagentes hidrofóbicos (Colombié *et al.*, 1998; Condoret *et al.*, 1997; Martins, Schein, *et al.*, 2013; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b). Em reações de esterificação que envolvem ácidos e álcoois de cadeia curta, a hidrofilicidade do suporte de imobilização pode afetar o equilíbrio químico da reação, propiciando a ionização do ácido (reduzindo o pH do microambiente enzimático e a disponibilidade da espécie não-ionizada que participa do equilíbrio) ou favorecendo os efeitos desnaturantes dos álcoois sob as lipases (Colombié *et al.*, 1998; Martins *et al.*, 2011; Ortiz *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2021b). Diferentes graus de hidrofobicidade e morfologia dos materiais levam a propriedades bem diferentes em termos de atividade, especificidade e estabilidade (Arana-Peña *et al.*, 2020; Tacias-Pascacio *et al.*, 2017). Alterações estruturais no suporte que adicionem grupos hidrofóbicos favorecem a interação do suporte com a lipase (Bernal, Illanes e Wilson, 2014; Rodrigues *et al.*, 2013). Um balanço entre hidrofobicidade e hidrofilicidade do suporte de imobilização pode ser interessante em alguns casos, tais como as reações em meios microemulsionados (síntese de ésteres de açúcares, por exemplo), ou em diversos exemplos bem-sucedidos de aplicações de agarose modificadas como suporte de imobilização (Abellanas-Perez *et al.*, 2023; Adlercreutz, 2013; Arana-Peña *et al.*, 2019; Lokha *et al.*, 2020; Rios *et al.*, 2019; Zucca, Fernandez-Lafuente e Sanjust, 2016).

A resistência das lipases imobilizadas é discutida em alguns trabalhos da literatura (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Garcia-Galan *et al.*, 2011; Ortiz *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2015b; Skoronski *et al.*, 2014; Wiemann *et al.*, 2009), considerando a necessidade de agitação do meio reacional para efetivo contato deste com o biocatalisador. O atrito ocasionado pela agitação, somado aos efeitos do ambiente químico do meio reacional e a temperatura, contudo, pode romper as ligações (fracas, em boa parte das vezes) entre o suporte e a lipase ou afetar a estrutura da partícula, compactando-a e reduzindo seu tamanho (Adlercreutz, 2013; Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Ortiz *et al.*, 2019). Neste sentido, pode-se adotar tanto materiais rígidos (silicatos ou óxidos inorgânicos, por exemplo) para resistir a pressões como no caso de reatores de leito fixo, quanto materiais flexíveis (celulose ou agarose, por exemplo) aptos a absorver o impacto como no caso dos reatores de agitação mecânica (Garcia-Galan *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2015b). O rompimento das ligações, mesmo que parcial, leva a uma redução do rendimento da reação devido à desestruturação do biocatalisador e perda de suas propriedades, com menor atividade geral do biocatalisador no meio e/ou redução da sua capacidade de reuso (Ortiz *et al.*, 2019). Alguns trabalhos destacam a relativa fragilidade das resinas comerciais Lewatit e Duolite, que se encontram em um patamar intermediário entre rigidez e flexibilidade (Ortiz *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2015b; Wiemann *et al.*, 2009). Neste sentido, a imobilização das lipases precisa se equilibrar entre a utilização de materiais robustos com as características químicas/morfológicas necessárias para um bom desempenho e de custos relativamente baixos.

Apesar das vantagens da imobilização, poucos trabalhos na literatura lidam com o escalonamento e a avaliação técnico-econômica da imobilização como etapas de um processo de obtenção de ésteres (Collaço *et al.*, 2020; Séverac *et al.*, 2011), ainda que alguns trabalhos afirmem se tratar de processos simples e de baixo custo (Cavallaro, Ercoli e Tonetto, 2017; Oliveira, de *et al.*, 2019). Deve-se considerar não apenas o custo do suporte de imobilização em si, mas também: i) os demais produtos químicos necessários no processo de imobilização e formulação do biocatalisador (tampões, estabilizantes, etc.), ii) o tempo do processo de imobilização e, iii) o rendimento de imobilização (a quantidade de enzima suportada no material) (Séverac *et al.*, 2011). A maior parte dos estudos de avaliação técnico-econômica preliminar para ésteres por biocatálise lida com lipases imobilizadas comerciais como um insumo fornecido hipoteticamente a um determinado custo (Andrade *et al.*, 2019; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2019; Taher *et al.*, 2020). Os custos de lipases imobilizadas são elevados, orbitando entre 100 e 1000 USD kg⁻¹ (Al-Zuhair S, Almenhali A, Hamad I, Alshehhi M e Mohamed, 2011; Andrade *et al.*, 2019; Nielsen, Brask e Fjerbaek, 2008; Serrano-Arnaldos *et*

al., 2019; Sousa *et al.*, 2021a; Tufvesson *et al.*, 2011a). A imobilização, ainda que utilizando protocolos simples e materiais relativamente baratos, embute custos que superam amplamente o custo estimado de lipases em sua forma livre, como por exemplo a comparação entre os custos da lipase líquida comercial Eversa Transform 2.0 (15 USD kg⁻¹) e a lipase imobilizada comercial Novozym 435 (1000 USD kg⁻¹) na estimativa adotada por Andrade e co-autores (2019) (Andrade *et al.*, 2019).

Dentre as lipases imobilizadas mais estudadas, destaca-se a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Lewatit VP OC 1600), comercialmente conhecida como Novozym 435. Este biocatalisador é o mais amplamente estudado na síntese de ésteres compostos relacionados; uma pesquisa simplificada na base de dados Web of Science revela 132 artigos contendo o termo “Novozym 435” no título do trabalho nos últimos 20 anos (“Portal Periódicos CAPES. CAPES”, 2024). A Novozym 435 tem como características marcantes: i) alta atividade enzimática em uma grande variedade de condições reacionais; ii) inespecífica em estereosseletividade; iii) tolerância à altas temperaturas (até próximas de 100 °C) por ser originária de levedura extremófila (*Candida antarctica*); iv) ampla tiposseletividade. Por outro lado, trabalhos na literatura apontam para sua baixa estabilidade operacional sob agitação mecânica (cisalhamento), possibilidade de dissolução de seu suporte de imobilização na presença de alguns álcoois e moléculas com estrutura tensoativa (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Hirata *et al.*, 2016a; Hirata *et al.*, 2016b; Ortiz *et al.*, 2019). A lipase de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina aniônica (Duolite ES 562) e comercializada pela Novozymes com o nome de Lipozyme RM IM também é amplamente estudada, sendo mais aplicada em estudos de produção de biodiesel e melhoramento de óleos e gorduras. A Lipozyme RM IM é um biocatalisador 1,3-específico, de alta atividade de esterificação e estabilidade em diversas condições reacionais (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010). Outra lipase bastante estudada é a formulação comercial da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, um biocatalisador também 1,3-específico, imobilizada em sílica – Lipozyme TL IM (Fernandez-Lafuente, 2010). Esta lipase é conhecida pela enantioseletividade e regioseletividade, sendo muito estudada em resolução de misturas racêmicas, processos de transesterificação e produção de lipídios estruturados, hidrólise de ésteres proquirais e produção de biodiesel (Fernandez-Lafuente, 2010). A Tabela 9 compila as principais características destes 3 biocatalisadores comerciais.

Tabela 9: Características das lipases imobilizadas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM.

| Lipase imobilizada | Suporte de imobilização | Caráter do suporte | Tamanho de partícula médio |
|--------------------|--|---------------------------|--|
| Novozym 435 | Lewatit VP OC 1600 (resina acrílica, baseada em divinil-benzeno em crosslinking com metacrilato) | Moderadamente hidrofóbico | 450 - 470 μm [a], indo de 350 - 1000 μm [b] |
| Lipozyme RM IM | Duolite ES 562 (resina de troca iônica macroporosa a base de copolímeros de fenol-formaldeído) | Moderadamente hidrofílico | 590 μm [c] |
| Lipozyme TL IM | Sílica granulada | Hidrofílico | 510 μm [c] |

Fontes: Zhao et al., 2015; [a] Haigh *et al.*, 2012; [b] Tufvesson *et al.*, 2011b; [c] Jenab *et al.*, 2014

Em suma, a imobilização das lipases é uma estratégia de processo fundamental para viabilização técnica da produção de ésteres por biocatálise, permitindo a catálise heterogênea e consequentemente o reuso do biocatalisador. Além disso, a imobilização promove o incremento tanto da atividade catalítica quanto da estabilidade do biocatalisador, permitindo que todo o potencial das lipases seja aproveitado em meios orgânicos com altas concentrações de substratos, bem diferente do ambiente natural em que atuam nos organismos vivos. A grande variedade de materiais e técnicas que podem ser adotadas para imobilização e os aspectos da engenharia do processo envolvidos, tornam o estudo deste tópico crucial para o desenvolvimento de processos biocatalíticos de produção de ésteres e de outros compostos químicos relevantes.

2.8 Aspectos gerais de engenharia química na rota biocatalítica para produção de ésteres

Geralmente, os estudos de síntese biocatalítica de ésteres em escala laboratorial utilizam o mesmo aparato que o utilizado em sínteses convencionais com catalisadores heterogêneos, tais como frascos agitados mecanicamente ou reatores do tipo STR (*Stirred*

Tank Reactor). Esta prática, ao mesmo tempo em que desconsidera algumas peculiaridades das lipases imobilizadas, pode ser interessante para mostrar o potencial dos biocatalisadores em substituir tecnologias já consolidadas sem demandar modificações profundas nas instalações industriais.

As etapas comuns neste tipo de estudo envolvem inicialmente a mistura ou dissolução dos reagentes (dependendo se a síntese ocorre com ou sem solvente), o condicionamento destes até a temperatura desejada e os ajustes relacionados a agitação apropriada do meio reacional. A partir de então, o (bio)catalisador é adicionado de uma única vez ao meio reacional para o início da reação, que normalmente é conduzida sob temperatura e agitação constantes até um tempo determinado. Ao término deste tempo, a agitação é desligada para apropriada separação do (bio)catalisador do meio e separação/purificação do éster formado, se pertinente (Cipolatti *et al.*, 2018; Hari Krishna, Sattur e Karanth, 2001; Kuperkar *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2013a; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2020; Vadgama, Odaneth e Lali, 2015). As etapas pós-reação (*downstream*, no jargão da engenharia química) geralmente não são incluídas nos estudos de síntese em escala laboratorial, ainda que grande parte dos desafios do escalonamento de um processo e de sua economicidade sejam relacionados a separação/purificação do produto do meio reacional (Fellechner, Blatkiewicz e Smirnova, 2019; Seader, 2011; Zhao *et al.*, 2015). A modificação de apenas um grupo funcional em uma molécula, em geral, não ocasiona uma mudança tão drástica de propriedades físico-químicas que permita uma fácil separação de misturas entre produto e reagentes não-reagidos (Woodley, 2022), como é que o ocorre por exemplo no caso da síntese do acetato de etila a partir do ácido acético e do etanol; etanol e acetato de etila tem pontos de ebulição muito similares (77 e 78 °C, respectivamente) e uma separação destes por destilação é, em certo grau, desafiadora (Gadekar-Shinde *et al.*, 2023).

Sendo um processo termodinamicamente controlado que necessita de excesso estequiométrico para atingimento de alto rendimento, uma reação de esterificação sem solvente tem ao fim do processo o produto formado e seu subproduto (a água), os reagentes não reagidos (em sua maioria o excesso estequiométrico utilizado para deslocamento do equilíbrio) e o biocatalisador (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Sousa *et al.*, 2021b). A efetividade de separação e reaproveitamento destes depende, basicamente, de i) as características físico-químicas das espécies químicas presentes e, ii) das quantidades destas espécies químicas no meio (Towler e Sinnott, 2013; Turton *et al.*, 2018). A Figura 5 compila as possibilidades para separação e purificação do éster formado do meio reacional.



Figura 5: Operações unitárias passíveis de serem adotadas nas etapas pós-reação em processos de produção de ésteres.

Fonte: O autor. Adaptado de Towler *et al.* (2013)

A remoção da água, além de necessária para a purificação do produto, também é fundamental para aumentar o rendimento da reação, já que o equilíbrio químico também pode ser deslocado para uma dada direção pela remoção de um dos produtos formados segundo o princípio de Le Chatelier (Gadekar-Shinde *et al.*, 2023; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b). Os trabalhos na literatura científica e patentária destacam para este fim a utilização de peneiras moleculares ou sais higroscópicos, a evaporação por aquecimento ou pressão reduzida, e a separação natural da água particionada em uma fase aquosa macroscópica (Gubicza *et al.*, 2000; Kempers *et al.*, 2016; Ortega-Requena *et al.*, 2024; Wang e Jiang, 2005; Xu, 2013). Estas estratégias tem vantagens e desvantagens; peneiras moleculares, por exemplo, permitem efetiva remoção da água *in situ*, contudo, tem reuso limitado, ao passo que as técnicas de pervaporação permitem operação contínua *in situ*, mas tem custo elevado (Xu, 2013).

Se a reação de esterificação não atingir a completa conversão dos ácidos carboxílicos à ésteres, a concentração de ácido residual pode vir a ser neutralizada com soluções alcalinas, mas tendo como inconveniente a formação de uma corrente de sais, que ao ser descartado

diretamente em corpos d'água ou no solo gera preocupações com eutrofização, a depender da concentração e dos íons envolvidos (Khan *et al.*, 2021; Xu, 2013). O excesso estequiométrico utilizado (geralmente de álcool) para deslocamento do equilíbrio pode ser separado por destilação, já que geralmente os ésteres tem ponto de ebulição diferente do álcool correspondente, e recirculado no processo como ocorre tipicamente nos processos de produção de biodiesel (Szczesna Antczak *et al.*, 2009; Xu, 2013). Todavia, há vários casos em que as diferenças de ponto de ebulição entre éster e álcool são discretas, particularmente na síntese de ésteres de cadeia curta, sendo o caso mais emblemático a separação acetato etil- etanol, que forma uma mistura azeotrópica, acarretando maior complexidade na separação (Gadekar-Shinde *et al.*, 2023).

Uma preocupação na síntese biocatalítica é o comportamento das lipases de acordo com a composição do meio reacional, já que estas podem ser afetadas pela hidrofiliidade do meio, pela acidez no microambiente enzimático, e por efeitos de inibição e inativação dos reagentes presentes (Bélafi-Bakó *et al.*, 2003; Diaz *et al.*, 2010; Halling, 1990; Hari Krishna *et al.*, 2001; Hari Krishna e Karanth, 2002; Mangiagalli *et al.*, 2022; Sandoval *et al.*, 2002; Valivety *et al.*, 1991). As sínteses de ésteres oriundos de ácidos e álcoois de cadeia média/longa geram um meio reacional hidrofóbico, no qual a camada de hidratação das lipases (responsável pela flexibilidade necessária para a atividade catalítica) não é afetada; ademais, ácidos e álcoois de cadeia média/longa não apresentam intenso potencial de inibição de lipases como atestam estudos de modelagem cinética em síntese enzimática (Alves, Cren e Mendes, 2016; Chowdhury e Mitra, 2015; Foresti *et al.*, 2008; Lima, Peres e Mendes, 2018; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2020; Silva, da *et al.*, 2020). Como a hidrofobicidade inicial do meio reacional já é elevada nestes casos, e aumenta ainda mais à medida em que o éster é formado, ocorre naturalmente um particionamento da água formada, que limita a ocorrência da reação inversa da esterificação, a hidrólise (Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b). Assim, mesmo as sínteses de ésteres de cadeia média/longa sem deslocamento do equilíbrio pelo excesso estequiométrico ou remoção da água formada já atingem conversões relativamente altas (acima de 70%), como atestado experimentalmente por diversos estudos (Garcia, T. *et al.*, 1999; Gawas, Jadhav e Rathod, 2016; Rocha, Gil e Garcia, 1999; Sandoval *et al.*, 2002; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2021a; Yadav e Thorat, 2012). Desta forma, as sínteses de ésteres de cadeia média e longa podem ser realizadas com relativa facilidade por lipases imobilizadas, já que estes meios reacionais favorecem a atividade catalítica das lipases e tem uma termodinâmica favorável. Já nas sínteses envolvendo ácidos e

álcoois de cadeia curta, estes reagentes podem interagir fortemente com a camada de hidratação das lipases devido ao caráter hidrofílico, levando à distorções que podem gerar restrições cinéticas na reação (redução da atividade catalítica) ou inativação do biocatalisador (Banik *et al.*, 2016; Bezbradica *et al.*, 2007; Hari Krishna *et al.*, 2001; Idris e Bukhari, 2012; Laane *et al.*, 1987; Marty, Dossat e Condoret, 1997). Contrariamente ao caso das sínteses de ésteres de cadeia média e longa, o meio reacional na síntese de ésteres de cadeia curta fica apenas moderadamente hidrofóbico ao longo da reação, tornando o processo mais dependente das estratégias de deslocamento do equilíbrio para atingimento de altas conversões. E, por último, ácidos e álcoois de cadeia curta são amplamente discutidos na literatura como inibidores potentes da atuação das lipases (Claon e Akoh, 1993; Couto *et al.*, 2011; Gawas, Jadhav e Rathod, 2016; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Hari Krishna *et al.*, 2001; Ikeda e Kurokawa, 2001; Kuperkar *et al.*, 2014; Lotti *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021c). Portanto, as sínteses de ésteres de cadeia curta com lipases imobilizadas demandam maior esforço de otimização.

As questões acima levantadas acerca da síntese de ésteres de cadeia curta podem levar à adoção de estratégias como as bateladas alimentadas, nas quais evita-se a concentração excessiva de um determinado reagente no meio, como é o caso da obtenção de ésteres metílicos ou etílicos (FAME ou FAEE) para biodiesel (Aguieiras *et al.*, 2017; Szczesna Antczak *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2003). Em decorrência do possível efeito danoso do meio sobre as lipases, também podem ser adotadas estratégias para controle da atividade termodinâmica da água e a adição de baixas quantidades de água ao meio (para atingimento do ótimo de hidratação de cada lipase) (Adlercreutz, 2013; Colombié *et al.*, 1998; Foresti *et al.*, 2007; Ghamgui, Karra-Chaabouni e Gargouri, 2004; Goldberg, Thomas e Legoy, 1990; Halling, 1990; Halling *et al.*, 2004). Em última instância, pode ser conduzida a síntese em presença de solvente, na qual virtualmente se eliminam os problemas acima citados (Laane *et al.*, 1987; Tacias-Pascacio *et al.*, 2017). Contudo, a presença de solventes é indesejável, pois reduz a produtividade do processo como um todo, demandando etapas e equipamentos adicionais para separação e reciclo do solvente ao meio (Nielsen, Brask e Fjerbaek, 2008; Ortega-requena *et al.*, 2024; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b; Towler e Sinnott, 2013). Para exemplificar a problemática do uso de solventes, o trabalho de Salah e co-autores (2007) (Salah, Ben *et al.*, 2007) avaliou a síntese do acetato de butila catalisada por lipase de *Rhizopus oryzae* imobilizada em presença de *n*-heptano e em meio sem solvente. Com solvente, a reação atinge conversão de 80% após 12 h; em meio sem solvente nas mesmas

condições reacionais, atinge 60% de conversão. Apesar de significativa redução da conversão, calculando a concentração de produto obtido nas duas condições, chegamos a concentrações de 18,6 g L⁻¹ e 334,0 g L⁻¹, respectivamente. Por consequência, a produtividade volumétrica da síntese nos dois casos é de 1,5 g L⁻¹ h⁻¹ e 27,8 g L⁻¹ h⁻¹, respectivamente, demonstrando a drástica redução da produtividade do processo em meios com solvente (18 vezes menor).

A produtividade, expressa em termos mássicos ou em termos volumétricos, é apenas uma das métricas possíveis para a avaliação de um processo químico (Tufvesson *et al.*, 2011a). Nos estágios iniciais de desenvolvimento de um processo, a economia atômica, a eficiência mássica de carbono, e o índice de valor agregado, são importantes parâmetros para definição da rota de produção a ser escolhida (Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014); já no desenvolvimento em escala laboratorial, a conversão da reação, a concentração de produto obtido ao fim da reação, a produtividade mássica/volumétrica e a produtividade (bio)catalítica, são primordiais para o atingimento de condições otimizadas de reação (Konzock e Nielsen, 2024; Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014; Woodley, 2022). A Figura 6 compila os indicadores principais, sua utilidade e fórmula de cálculo, frequentemente chamado de indicadores chave de desempenho (KPI – *Key Performance Indicators*) ou métricas de processo, que podem ser adotados tanto para um processo como um todo ou apenas para etapas específicas deste, como o caso da reação química em si, englobando diferentes aspectos – econômicos, energéticos, ambientais, regulatórios, de segurança operacional, dentre outros (Lindberg *et al.*, 2015). Em nível industrial, nos quais altos investimentos em capital estão envolvidos, as métricas econômicas são preponderantes e orientam as metas para os demais indicadores operacionais durante o desenvolvimento do processo (Towler e Sinnott, 2013; Turton *et al.*, 2018).

| Métrica | Fórmula de Cálculo | Principal contribuição ao processo |
|-------------------------------------|--|---|
| Economia Atômica | $EA = \frac{\text{MM do produto}}{\sum \text{MM dos reagentes}}$ | A Economia Atômica e Eficiência mássica de carbono auxiliam na definição de qual rota de produção é a mais interessante. Uma rota com maior EA e maior CME gera relações mais diretas entre massa de insumo e massa de produto acabado, com menores massas de resíduo gerado por ciclo. |
| Eficiência mássica de carbono (CME) | $CME = \frac{m_c \text{ produto} \times 100}{\sum m_c \text{ reagentes}}$ | |
| Fator E | $E = \frac{\sum m_{\text{resíduos}} - m_{\text{água}}}{m_{\text{produto}}}$ | Indicativo da quantidade mássica de resíduo gerado no processo (descontando-se a formação de água) por quantidade mássica de produto. |
| Índice de agregação de valor (IAV) | $IAV = \frac{m_c \text{ prod} \times \$ \text{ prod}}{\sum m_c \text{ reag} \times \$ \text{ reag}}$ | Indicativo da rentabilidade do processo ao comparar custos totais dos reagentes e valor de venda do produto. Rotas com IAV menor que 1 são inviáveis – matérias-primas mais caras do que produto final. |
| Produtividade volumétrica (STY) | $STY = \frac{V \text{ prod}}{V \text{ reator} \times \text{Tempo de reação}}$ | Indica o aproveitamento do volume do reator ao longo do tempo. Processos com STY próximos a 1 (L L ⁻¹ h ⁻¹) indicam altas produtividades volumétricas. |
| Produtividade catalítica | $\text{Prod. Cat.} = \frac{m \text{ produto}}{m \text{ catalisador}}$ | Indica a eficiência do catalisador na reação. Processos com altas produtividades catalíticas (kg produto kg catalisador ⁻¹) indicam que grande quantidade de produto pode ser produzida por uma pequena quantidade de catalisador. |

Figura 6: Compilação de métricas de processo, fórmulas de cálculo e principal informação obtida com cada uma.

Fonte: Adaptado de Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley *et al.*, 2014.

O reuso do catalisador é desejável do ponto de vista operacional e econômico, por reduzir os custos de aquisição bem como evitar sucessivas etapas de recarregamento de catalisador a cada ciclo no reator e descartes frequentes (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Nielsen, Brask e Fjerbaek, 2008; Sousa *et al.*, 2021a; Tufvesson *et al.*, 2011a). O reuso é diretamente proporcional à produtividade catalítica do processo. A separação do biocatalisador imobilizado, para posterior reuso, pode se dar geralmente por operações simples de separação sólido-líquido como filtração, peneiramento ou centrifugação (Balcão, Paiva e Malcata, 1996; Nielsen, Brask e Fjerbaek, 2008; Tacias-Pascacio *et al.*, 2017). O dimensionamento da operação unitária mais adequada depende essencialmente do tamanho da partícula do biocatalisador e sua densidade. A Figura 7 mostra esquematicamente a relação entre tamanho de partícula e a operação unitária mais indicada. Os biocatalisadores comerciais mais estudados – Novozym 435, Lipzyme RM IM e Lipzyme TL IM – tem tamanhos de partícula diversos, que vão de 400 a 600 µm, conforme mostrado na Tabela 10. As características físicas e químicas do suporte de imobilização do biocatalisador são muito importantes neste aspecto, ainda que poucos trabalhos na literatura estudem a imobilização sob a perspectiva da maior ou menor facilidade de separação do biocatalisador do meio reacional (Moreira *et al.*, 2020; Silva, da *et al.*, 2020). Adicionalmente, podem ser necessárias

etapas de lavagem e secagem do biocatalisador imobilizado, a depender da natureza do meio reacional, já que a presença de resíduos nas partículas do biocatalisador pode levar a efeitos danosos diversos, como a dissolução do suporte de imobilização, alterações na morfologia e porosidade do suporte, ou a inativação deste (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Martins *et al.*, 2011; Xu, 2013). Todavia, etapas adicionais para tratamento do biocatalisador pós-reação trazem custos adicionais em um contexto no qual o catalisador, via de regra, já tem um custo elevado. Assim, a capacidade de reuso do biocatalisador em repetidos ciclos de reação (ou em horas contínuas de operação) deve ser tão alta quanto possível sem demandar processos adicionais de tratamento.

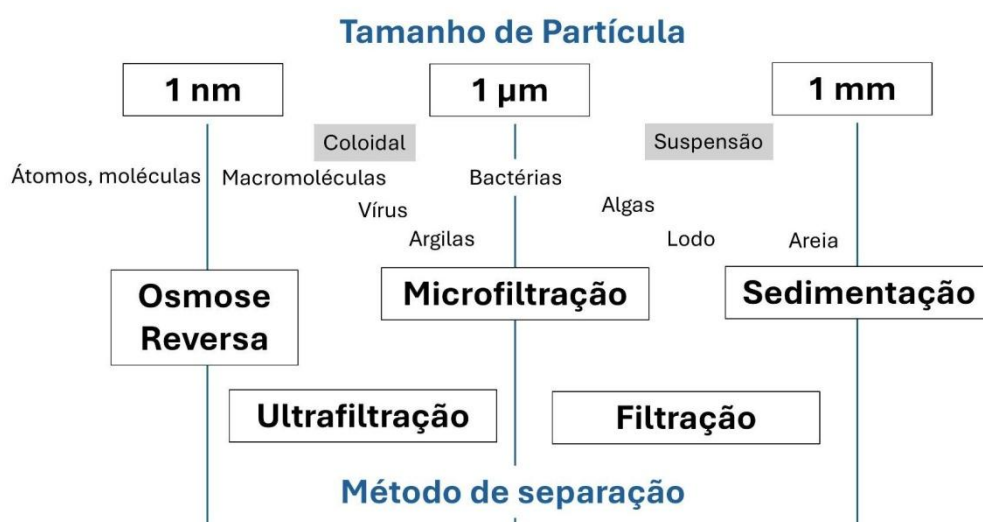


Figura 7: Relação entre tamanho de partícula e operação de separação mais adequada.

Fonte: Adaptado de Wakeman, 2011 (Thermopedia.com)

Um processo biocatalítico para síntese de ésteres com lipases imobilizadas deve garantir que a reação de esterificação ocorra sob altas taxas reacionais mantendo a estabilidade operacional do biocatalisador e permitindo seu reuso. Estas demandas dependem fortemente da natureza do meio reacional, das características do biocatalisador e do tipo de reator no qual reagentes e biocatalisador estão em contato.

2.8.1 Reatores do tipo STR

Reatores são equipamentos industriais nos quais se dão as reações químicas, com variadas geometrias e tamanhos, garantindo que reagentes e (bio)catalisador estejam em adequado contato, vencendo as limitações difusionais de transferência de massa e criando as condições hidrodinâmicas ótimas para a reação (Hartmeier, 1986; Towler e Sinnott, 2013). Os reatores agitados (*Stirred Tank Reactors*, ou STR) consistem basicamente em um vaso cilíndrico com um dispositivo central de agitação (impelidor) que uniformiza a distribuição de calor e massa no meio (Balcão, Paiva e Malcata, 1996; Poppe *et al.*, 2015). São equipamentos de construção simples, baixo custo, aplicáveis à uma grande gama de compostos químicos, seja em modo batelada ou contínuo, e amplamente estudados (Hartmeier, 1986).

Reatores agitados são amplamente utilizados na indústria química, com grande variedade de tipos de impelidores de acordo com as características do meio reacional (particularmente a viscosidade e a presença de sólidos em suspensão). Na literatura sobre síntese enzimática de ésteres há uma ampla variedade de estudos que utiliza reatores do tipo STR, a grande maioria em modo batelada (Balcão, Paiva e Malcata, 1996; Tufvesson *et al.*, 2010; Wierschem *et al.*, 2017), conforme demonstrado no artigo de revisão publicado por Ortega-Requena e co-autores (2024) (Ortega-Requena *et al.*, 2024). Em escala laboratorial, os STR são frascos de vidro agitados orbitalmente em *shakers* ou com bastões magnéticos no fundo, ou ainda vasos estáticos com impelidores mecânicos em determinada velocidade de agitação (rotações por minuto). Todavia, este tipo de reator tem contraindicações quando utilizado com biocatalisadores imobilizados sob agitação intensa, já que possíveis efeitos abrasivos e de cisalhamento podem afetar a estabilidade operacional destes (Balcão, Paiva e Malcata, 1996; Hartmeier, 1986; Poppe *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015).

A agitação de qualquer meio reacional deve propiciar adequado contato entre as diferentes fases do sistema para que a reação química aconteça. Em reações de esterificação, a agitação do meio não é reportada na literatura como um fator crítico. Em um processo biocatalítico utilizando-se lipases imobilizadas, há dois tipos de transferência de massa – interna e externa. A interna é controlada por difusão molecular dos substratos da reação dentro do material do suporte de imobilização, sem estar sujeita aos efeitos da agitação mecânica; já a transferência de massa externa é afetada pela agitação mecânica (Bolivar, Woodley e Fernandez-Lafuente, 2022; Hartmeier, 1986; Parikh, Lanjekar e Rathod, 2019; Zhao *et al.*, 2015). Porém, dentre os estudos consultados poucos se dedicaram a explorar

experimentalmente o assunto; atingida uma velocidade suficiente para promover boa dispersão do biocatalisador no meio, observa-se que a influência da agitação no rendimento da reação passa a ser mínima, indicando que não há limitações significativas de transferência de massa externa, como nos casos da síntese de propionato de isobutílica estudada por Kuperkar e co-autores (2014) (Kuperkar *et al.*, 2014), na síntese de laurato de etila estudada por Gawas e co-autores (2012) (Gawas, Jadhav e Rathod, 2016), na síntese de acetato de isoamila estudada por Güvenç e co-autores (2002) (Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002), na síntese de caprato de propila estudada por Parikh e co-autores (2019) (Parikh, Lanjekar e Rathod, 2019) e na obtenção de ésteres metílicos via transesterificação por Ognjanovic e co-autores (2009) (Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, 2009). Para operação de um STR em modo batelada, o biocatalisador precisa ser separado (geralmente por filtração) ao término da reação e, em modo contínuo, o biocatalisador precisa ser retido através de uma peneira dentro do reator ou continuamente realimentado junto com os reagentes (Balcão, Paiva e Malcata, 1996; Hartmeier, 1986; Poppe *et al.*, 2015).

A agitação em um reator do tipo STR é tanto mais efetiva quanto mais turbulenta, e para tal existem diversos dispositivos que torna a mistura do conteúdo do reator mais efetiva, a depender da composição do meio reacional (Towler e Sinnott, 2013). A movimentação dos impelidores se dá pela ação de um motor elétrico. Uma preocupação decorrente disto em um processo em batelada é o tempo de reação, que demandará contínuo consumo de energia elétrica para movimentação dos impelidores e agitação do meio (Serrano-Arnaldos *et al.*, 2019).

Ainda que a velocidade e a forma de agitação em reatores agitados não sejam objetos de estudo comuns em sínteses de ésteres catalisadas por lipases imobilizadas, a questão do reuso do biocatalisador quase sempre é estudada. Contudo, não se estabelece uma associação explícita entre elas, como o preconizado por Woodley & Titchener-Hooker (1996) ao definirem as “janelas de operação” (Woodley e Titchener-Hooker, 1996). A janela de operação é uma faixa de valores correlacionados de duas ou mais variáveis que favorece um determinado parâmetro operacional, como por exemplo na agitação, em que um balanço deve ser encontrado entre a potência de agitação e a carga de biocatalisador, para promover simultaneamente uma adequada suspensão do biocatalisador evitando limitações de transferências de massa com mínimos danos à sua integridade (Woodley e Titchener-Hooker, 1996; Xu, 2013; Zhao *et al.*, 2015). Ognjanovic e co-autores (2009) (Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, 2009) sugeriram que a agitação foi a causa primária para a inativação da

Novozym 435 em um processo de transesterificação, contornando a baixa estabilidade operacional da lipase imobilizada em tanque agitado com a adoção de um reator de leito fixo. O artigo de revisão de Ortiz e co-autores (2019) (Ortiz *et al.*, 2019) discorre a respeito da fragilidade mecânica da resina Lewatit, que é o material de suporte da Novozym 435. Ainda que na escala laboratorial – com velocidades e potências dos dispositivos de agitação relativamente baixas – o problema não fique tão evidente, em escala industrial a questão pode se tornar mais drástica, tanto do ponto de vista operacional (finas partículas do suporte podem gradativamente entupir filtros, por exemplo), quanto do ponto de vista econômico (menor capacidade de reuso implica em maior dispêndio de biocatalisador em reposições frequentes no processo) (Garcia-Galan *et al.*, 2011; Ortiz *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2015a). As perspectivas de novas tecnologias para agitação em reatores agitados, bem como a adoção de outros tipos de reatores, são mencionadas na tese de Yuan Xu (2013) visando aumentar a produtividade catalítica dos processos com lipases imobilizadas (Xu, 2013).

2.8.2 Reatores multifásicos – reator de coluna de bolhas

Os reatores multifásicos são aqueles em que as fases sólida, líquida e gasosa agem simultaneamente no mesmo meio reacional, contemplando os reatores de leito fixo, leito empacotado e leito fluidizado (Dudukovic, Larachi e Mills, 2007, 1999; Kashid e Kiwi-minsker, 2009). Um dos primeiros exemplos de uso de reatores de leito fluidizado com enzimas imobilizados é o trabalho de Liebermann & Ollis (1975) (Lieberman e Ollis, 1975), que estudaram a hidrólise da tributirina com uma lipase pancreática imobilizada (Guisan, 2006). Dentro dos reatores de leito fluidizado, um dos modelos possíveis de reator é o reator de coluna de bolhas (BCR). Reatores de coluna de bolhas são, basicamente, vasos cilíndricos nos quais um gás, injetado pela base por um dispositivo distribuidor (borbulhador), entra em contato com um meio reacional líquido, que pode ou não conter sólidos em suspensão (Kantarci, Borak e Ulgen, 2005; Youssef, Al-Dahhan e Dudukovic, 2013). Os reatores de colunas de bolhas geralmente tem relação de aspecto (diâmetro x altura) de 1:2 a 1:10; são equipamentos de construção e operação simples por não possuírem equipamentos adicionais para agitação em seu interior, tal como os reatores agitados que possuem impelidores (Kulkarni e Joshi, 2011; Rollbusch *et al.*, 2015; Youssef, Al-Dahhan e Dudukovic, 2013). A agitação do meio reacional é promovida pela ascensão das bolhas de gás (um gás inerte ou mesmo um dos reagentes em estado vapor) pelo vaso. Esta agitação promovida pelas bolhas

de gás propicia transferência de massa e calor eficientes, permitindo a eficaz utilização do (bio)catalisador (Kashid e Kiwi-minsker, 2009), superiores às observadas em sistemas bifásicos (Yu *et al.*, 2019) ou reatores de leito fixo/empacotado (Guisan, 2006; Zhao *et al.*, 2015).

Reatores multifásicos são também amplamente utilizados na indústria química; uma das aplicações mais populares são os reatores de leito fluidizado usados no craqueamento catalítico de frações pesadas do petróleo para geração de frações leves como a gasolina automotiva (Weimer, 1997). Mais especificamente, reatores de coluna de bolhas são utilizados industrialmente em reações de Fischer-Tropsch, em processos de oxidação, cloração, alquilação, polimerização, fermentação, cultivo de microalgas para fins industriais e aplicações variadas em bioprocessos (Youssef, Al-Dahhan e Dudukovic, 2013). Uma pesquisa simplificada na plataforma WIPO Patentscope, utilizando o termo “bubble column reactor” na página inicial do documento patentário, revelou 933 patentes de processos químicos e biotecnológicos utilizando reatores de coluna de bolhas (“OMPI – Pesquisa nas coleções internacionais e nacionais de patentes”, [s.d.]). Os estudos do grupo de pesquisa em biocatálise da Universidade Técnica de Hamburgo (Alemanha) com reatores de coluna de bolhas e lipases imobilizadas foram a base para a implantação de uma das poucas aplicações industriais da biocatálise aplicada à ésteres – a produção de ésteres emolientes (cadeia longa e ramificada) pela Evonik Industries AG. Para o caso específico dos ésteres há outras duas vantagens decisivas – uma cinética e outra termodinâmica: a ascensão das bolhas na coluna permite a agitação do meio com um baixo impacto na estabilidade operacional do biocatalisador, preservando a integridade das partículas e sua atividade catalítica (Ortega-requena *et al.*, 2024; Yu *et al.*, 2019), e também auxilia na remoção da água formada no meio reacional, deslocando o equilíbrio químico da reação no sentido da síntese permitindo maiores rendimentos em ésteres (Baum *et al.*, 2016). Por outro lado, reatores de coluna de bolhas tem como desvantagens a dificuldade no controle no tamanho e formato das bolhas, característica decisiva para a efetividade transferência de massa, e a dificuldade em separar o (bio)catalisador do meio e fluidos com pequenas diferenças de densidade (Kashid e Kiwi-minsker, 2009).

Os reatores de coluna de bolhas precisam, em uma reação de esterificação, atender simultaneamente aos seguintes objetivos: agitar o meio reacional, manter o (bio)catalisador em suspensão, permitir adequada difusividade dos reagentes no (bio)catalisador e, remover a água formada do meio reacional. O atingimento destes objetivos é limitado por algumas

características do meio reacional (viscosidade, por exemplo) e do (bio)catalisador (tamanho de partícula e porosidade, por exemplo), que vão ditar a quantidade de energia requerida pelo sistema por volume e os coeficientes de transferência de massa (Baum *et al.*, 2016). O estudo da hidrodinâmica do meio reacional e da transferência de massa em um reator de coluna de bolha é complexo e dependente da natureza do fluxo dentro do reator (laminar ou turbulento). O regime de admissão de gás é estudado geralmente através da análise do formato, tamanho e velocidade das bolhas, que por sua vez é dependente das condições de operação do reator – vazão de gás, concentração de sólidos, diâmetro das partículas, etc. – e do desenho do reator – forma do borbulhador, diâmetro da coluna, etc. (Forret *et al.*, 2006).

Estudos de síntese biocatalítica de ésteres com reatores de coluna de bolhas não são frequentes na literatura. O recente artigo de revisão publicado por Ortega-Requena (2024) (Ortega-requena *et al.*, 2024) a respeito de reatores para processos biocatalíticos de obtenção de ésteres cita apenas 2 trabalhos que utilizam reatores de coluna de bolhas e dedica poucas menções a este tipo de reator para esta aplicação ao longo do texto. Uma pesquisa simplificada na plataforma Web of Science revelou apenas 5 estudos contendo os termos “BUBBLE COLUMN” e “LIPASE” no título dos artigos e, destes, apenas 3 referiam-se a estudo de síntese de ésteres (“Portal Periódicos CAPES. CAPES”, 2024). Todavia, conforme destacado por Liu e co-autores (2016) (Liu *et al.*, 2016) e Baum e co-autores (2016) (Baum *et al.*, 2016), os reatores de coluna de bolhas, além das já citadas vantagens, tem como atributo principal contribuir com o aumento do reuso das lipases imobilizadas, que são biocatalisadores de custo elevado.

2.9 Reuso do biocatalisador

Um dos aspectos mais importantes em catálise heterogênea é o reaproveitamento do catalisador em seguidos ciclos de reação. Em muitas situações, os catalisadores são materiais de maior valor agregado do que o produto da reação em que participa, tendo um potencial de impactar severamente o custo operacional de um processo. O reuso do catalisador heterogêneo (catalisador sólido em um meio reacional líquido) é possível nas situações em que sua estabilidade operacional e sua atividade catalítica se mantêm ao término da reação em um processo batelada ou por repetidas horas em um processo contínuo (Tufvesson *et al.*, 2011a; Tufvesson *et al.*, 2011b).

No caso dos biocatalisadores, particularmente lipases imobilizadas de alto desempenho e elevado custo de aquisição, o reuso passa a ser condição crucial para a viabilidade econômica do processo (Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, 2009; Séverac *et al.*, 2011; Sousa *et al.*, 2021a; Zhao *et al.*, 2015). Um número vasto de estudos de síntese enzimática de ésteres na literatura reporta a possibilidade de reuso das lipases imobilizadas e determina experimentalmente a quantia de reusos possíveis sem perda significativa de atividade enzimática (limitada geralmente a até 10% da atividade inicial). De modo geral, observam-se reusos inferiores a 10 ciclos sequenciais de reação em frascos agitados, conforme mostrado na Tabela 10.

Tabela 10: Compilação de estudos de síntese enzimática de ésteres com lipases imobilizadas que incluem avaliação do reuso do biocatalisador na condição reacional considerada como ótima.

| Éster | Condição reacional | Conversão atingida (%) | Nº reuso sequenciais | Ref |
|-------------------------|--|------------------------|----------------------|----------------------------------|
| Formato de Octila | Frasco agitado (150 rpm), 40 °C, razão molar ácido:álcool 1:7, 1 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (15 g L ⁻¹) Solvente: 1,2 dicloroetano | 96,5 | 10 | (Baek <i>et al.</i> , 2020) |
| Acetato de Butila | Frasco agitado (200 rpm), 40 °C, razão molar ácido:álcool 1:3, 2,5 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (7,5% m/m) Solvente: <i>n</i> -hexano | 90,0 | 5 | (Martins <i>et al.</i> , 2011) |
| Propionato de Isobutila | Frasco agitado (300 rpm), 40 °C, razão molar ácido:álcool 1:3, 10 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (5% m/m) | 92,5 | 7 | (Kuperkar <i>et al.</i> , 2014) |
| Butirato de Isobutila | Frasco em banho de ultrassom (40 KHz, 220 W), 45 °C, razão molar ácido:álcool 1:1, 2,5 h de reação. Biocatalisador: Lipozyme RM IM | 86,0 | 4 | (Fallavena <i>et al.</i> , 2014) |

| | | | | |
|----------------------------|---|------|----|---|
| (14% m/m) | | | | |
| Solvente: <i>n</i> -hexano | | | | |
| Valerato de Etila | Frasco em microondas (50 W), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:1, 0,7 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (10 g L ⁻¹) | 69,2 | 2 | (Bhavsar e Yadav, 2018) |
| Caprilato de butila | Frasco agitado (250 rpm), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:2, 5 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (2% m/v) | 92,5 | 5 | (Sose, Bansode e Rathod, 2017) |
| Caprilato de octila | Frasco agitado, 65 °C, razão molar ácido:álcool 1:1,3, 3 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (1,5% m/m) | 99,3 | 4 | (Sousa <i>et al.</i> , 2020) |
| Caprato de propila | Frasco agitado (300 rpm), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:3, 5 h de reação. Biocatalisador: Fermase CALB 1000 (2% m/m) | 83,8 | 4 | (Parikh, Lanjekar e Rathod, 2019) |
| Caprato de octila | Frasco agitado (200 rpm), 50 °C, razão molar ácido:álcool 1:1,3, 24 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (4% m/m) | 96,0 | - | (Sousa <i>et al.</i> , 2021a) |
| Laurato de etila | Frasco agitado (200 rpm), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:1, 4 h de reação. Biocatalisador: Fermase CALB 1000 (2% m/m) | 92,4 | 3 | (Gawas, Jadhav e Rathod, 2016) |
| Laurato de octila | Frasco agitado (200 rpm), 50 °C, razão molar ácido:álcool 1:1,3, 2 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (4% m/m) | 99,0 | 2 | (Sousa <i>et al.</i> , 2021a) |
| Laurato de hexadecila | | 98,1 | | |
| Miristato de hexadecila | Frasco agitado sob vácuo, 70 °C, razão molar ácido:álcool 1:1, 1 h de reação. Biocatalisador: Lipozyme RM IM (5% m/m) | 97,3 | 15 | (Serrano-Arnaldos <i>et al.</i> , 2018) |
| Palmitato de hexadecila | | 97,1 | | |
| Estearato de | | 95,8 | | |

hexadecila

| | | | | |
|-------------------------|--|------|---|----------------------------------|
| Miristato de isopropila | Frasco agitado (150 rpm), 50 °C, razão molar ácido:álcool 1:15, 5 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (4% m/m) | 87,7 | 8 | (Vadgam a, Odaneth e Lali, 2015) |
| Miristato de isopentila | Frasco em microondas sob agitação (50 W, 400 rpm), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:1, 1 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (0,38% m/v) | 96,0 | 3 | (Yadav e Thorat, 2012) |
| Palmitato de isopropila | Frasco agitado (600 rpm), 77 °C, razão molar ácido:álcool 1:1, 2 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (7% m/m) | 88,0 | - | (Garcia, T <i>et al.</i> , 1999) |
| Estearato de etila | Frasco agitado (250 rpm), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:5, 5 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (1% m/m) | 92,0 | 2 | (Pereira <i>et al.</i> , 2018) |
| Estearato de butila | Frasco agitado (250 rpm), 60 °C, razão molar ácido:álcool 1:2, 5 h de reação. Biocatalisador: Novozym 435 (1% m/m) | 92,0 | 3 | (Pereira <i>et al.</i> , 2018) |
| Oleato de etila | Frasco agitado, 40 °C, razão molar ácido:álcool 4:1, 5 h de reação. Biocatalisador: Lipozyme (200 mg) | 99,0 | - | (Sandova l <i>et al.</i> , 2002) |
| Oleato de octila | Frasco agitado, 37 °C, razão molar ácido:álcool 1:3,5, 10 h de reação. Biocatalisador: Lipozyme imobilizada (50 mg) | 82,0 | - | (Rocha, Gil e Garcia, 1999) |

Dada à grande variedade de condições reacionais, não é possível correlacionar diretamente maior ou menor capacidade de reuso das lipases imobilizadas na síntese de ésteres de diferentes tamanhos de cadeia ou na presença/ausência de solventes, ainda que a literatura aponte para a dificuldade de diversas lipases tolerar altas concentrações de ácidos e álcoois de cadeia curta por um número longo de horas (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Babaki *et al.*, 2015; Hernández-Martín e Otero, 2008; Mangiagalli *et al.*, 2022; Marín-Suárez

et al., 2019; Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, 2009). Adicionalmente, dentre os trabalhos consultados mostrados na Tabela 10, a maior capacidade de reuso identificada foi na síntese de ésteres de cadeia longa (15 reusos) com Lipozyme RM IM estudada por Serrano-Arnaldos e co-autores (2018) (Serrano-Arnaldos *et al.*, 2018). A avaliação da reuso das lipases imobilizadas na literatura é descrita em abordagens do tipo “caso a caso” e a maioria dos estudos trata o reuso apenas no âmbito descritivo, limitando-se a constatar brevemente quantos reusos são possíveis na condição reacional considerada como ótima, sem considerar em profundidade a causa do número baixo/alto de reusos (Alves, Cren e Mendes, 2016; Gawas, Jadhav e Rathod, 2016; Kuperkar *et al.*, 2014; Pereira *et al.*, 2018; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2020; Vадgama, Odaneth e Lali, 2015). Contudo, a compreensão das possíveis causas que ocasionam a redução da atividade enzimática, desativação enzimática e desnaturação proteica podem levar a observações mais amplas sobre o reuso das lipases imobilizadas, considerando: i) agregação de enzimas e/ou agregação de partículas do suporte (Lima, de *et al.*, 2018; Mangiagalli *et al.*, 2022; Ortiz *et al.*, 2019; Wilson *et al.*, 2006); ii) exposição prolongada à ambiente ácido, reagentes desnaturantes, reagentes que afetem a camada de hidratação das enzimas ou que afetem o suporte (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Marín-Suárez *et al.*, 2019; Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, 2009); e iii) exposição prolongada a agitação intensa e altas temperaturas (Babaki *et al.*, 2016; Balcão, Paiva e Malcata, 1996; Ognjanovic, Bezbradica e Knezevic-Jugovic, 2009; Zhao *et al.*, 2015). Apesar da existência de diversos estudos de estabilidade de lipases imobilizadas disponíveis na literatura, estudos mais aprofundados sobre o reuso de lipases imobilizadas ainda são escassos na literatura (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Marín-Suárez *et al.*, 2019; Sousa *et al.*, 2021a).

Sendo as lipases imobilizadas insumos de alto custo, toda a economicidade de um processo biocatalítico se apoia em um cuidadoso processo de seleção do biocatalisador, de equipamentos e de condições reacionais que favoreçam o máximo do desempenho do biocatalisador e sua capacidade de reuso.

2.10 Aspectos econômicos da rota biocatalítica

As rotas químicas para produção de ésteres são bastante consolidadas na indústria química, tendo em vista a ampla disponibilidade de catalisadores aplicáveis e expertise em processos de separação comuns a vários outros processos industriais (Gadekar-Shinde *et al.*,

2023; Khan *et al.*, 2021). A adoção de novas rotas de produção para ésteres depende de um conjunto robusto de vantagens que permitam agregação de valor na produção, ganhos mercadológicos específicos, ganhos ambientais e/ou superação de barreiras legais, mantendo tanto quanto possível as infraestruturas disponíveis (Gadekar-Shinde *et al.*, 2023; Sheldon e Woodley, 2018).

A substituição de catalisadores por biocatalisadores na síntese de ésteres, neste contexto, mostra-se ao mesmo tempo atrativa e desafiadora, pelos seguintes pontos, compilados na Tabela 11.

Tabela 11: Vantagens e desafios da biocatálise aplicada a produção de ésteres

| Vantagens | Desafios |
|--|--|
| Produtos de maior pureza | Alto custo das enzimas imobilizadas |
| Economia potencial em processos de separação e tratamento de efluentes | Custo potencialmente elevado do biocatalisador em relação a possíveis produtos de baixo-médio valor agregado (<i>commodities</i> , <i>especialidades químicas</i>) |
| Economia de energia (condições brandas de reação) | |
| Redução de emissões de gases de efeito estufa, pegada de carbono e pegada hídrica | Menor disponibilidade de fornecedores de biocatalisadores em comparação com catalisadores convencionais |
| Aumento da segurança ocupacional para funcionários e entorno da planta, redução de riscos de acidentes e de sua severidade | Reposição de biocatalisador devido a perdas de estabilidade/atividade catalítica |
| | Inibição enzimática pelos reagentes (especialmente ácidos e álcoois de cadeia curta) |
| Reaproveitamento do biocatalisador (quando comparado com catalisador convencional em fase líquida) | Engenharia de reatores que conciliem elevada estabilidade operacional, reusabilidade e altas taxas reacionais |
| Viabilidade técnica de sínteses sem | |

solvente com altos rendimentos (ésteres de cadeia média ou longa)

Biocatalisador biodegradável e de origem renovável; ciclo de vida mais sustentável

Possibilidade de marketing verde, ambiental/sustentável para nichos de mercado específicos de maior valor agregado

Biodegradabilidade do biocatalisador depende também da biodegradabilidade do suporte de imobilização da enzima

Afirmarões a respeito das vantagens da biocatálise na literatura incluem, além dos aspectos tecnológicos, os aspectos econômicos (Lima-Ramos, Tufvesson e Woodley, 2014). Contudo, os aspectos econômicos não são usualmente abordados quantitativamente nos estudos (Sousa *et al.*, 2023a). A vantagem mais contundente é associada à especificidade das lipases, que leva à obtenção de ésteres mais puros, com remota possibilidade de reações paralelas e formação de subprodutos. Esta maior pureza tende a simplificar as operações de *downstream* do processo, com consequente redução de custos de capital e custos operacionais. Porém, esta potencial economia precisa ser avaliada dentro do contexto do processo – se o processo estudado não atinge o rendimento máximo da reação, se ultrapassa o limite máximo de reagentes não reagidos permitidos para certa aplicação, e/ou se é utilizado grande excesso estequiométrico de um dos reagentes na síntese, o *downstream* do processo não será nem tão simples nem tão econômico quanto preconizado. Outra vantagem mencionada é a menor demanda energética, já que processos biocatalíticos tendem a ocorrer em temperaturas mais brandas do que os processos conduzidos com catalisadores químicos, passando da ordem de 150-200 °C para 40-70 °C na reação. Todavia, em estudos de modelagem e simulação de processos é comum observar que o custo com utilidades – energia elétrica, vapor e água de processo para trocas térmicas – oscile entre 10% e 20% dos custos operacionais de uma planta industrial (SuperPro Designer, 2025). Nestes casos, mesmo que um processo biocatalítico gere economia de energia de 80%, essa economia estará restrita apenas a esta fatia dos custos operacionais de produção. O trabalho de Thum & Oxenbøll (2008) (Thum e Oxenbøll, 2008) compara a produção do éster miristato de miristila por processo químico e processo enzimático usando ferramentas de análise de ciclo de vida; neste estudo, identificaram reduções de 62% no dispêndio de energia, dentre outros benefícios ambientais da rota enzimática (Thum e Oxenbøll, 2008). Todavia, em um estudo de análise

técnico-econômico da produção de biodiesel com catalisadores químicos conduzido por Sakai e co-autores (2009) (Sakai, Kawashima e Koshikawa, 2009), o custo com utilidades para fins energéticos (vapor e energia elétrica) varia de 10 a 17% dos custos operacionais totais em quatro diferentes cenários estudados. Nem sempre a economia de energia por si só é significativa a ponto de viabilizar a substituição de uma tecnologia já consolidada por outra tecnologia emergente. As demais vantagens ambientais da rota biocatalítica citadas – o atendimento aos princípios da Química Verde, biodegradabilidade do biocatalisador, redução de emissões de gases de efeito estufa – não são quantificadas e precificadas de forma apurada nos estudos.

Assim como as vantagens econômicas da biocatálise são mencionadas genericamente, há também uma lacuna de dados quantitativos a respeito dos gargalos econômicos desta. A principal desvantagem é o custo dos biocatalisadores, particularmente as lipases em sua forma imobilizada, como já mencionado anteriormente. O maior desafio, neste sentido, é a viabilização da biocatálise para obtenção de produtos de baixo-médio valor de venda, que mesmo produzidos em larga escala, ainda apresentam contribuição percentual muito elevada do biocatalisador no custo geral de produção (Woodley, 2022). Uma diretriz para avaliar o custo do biocatalisador em relação aos ésteres obtidos pode ser obtida no trabalho de Tüfveesson e colaboradores (2011) (Tufvesson *et al.*, 2011a). Ésteres podem vir a se enquadrar como *commodities* ou especialidades químicas; no caso de especialidades químicas, com custo de venda orbitando em torno de 5 USD kg⁻¹, o desejável é que o custo do biocatalisador esteja limitado a 5% deste montante (0,25 USD kg⁻¹ de produto). Para atingir esta meta, é crucial trabalhar com cargas de biocatalisador reduzidas, o que requer um biocatalisador de alta atividade enzimática e/ou baixo custo e/ou que permita um elevado número de reusos (Tufvesson *et al.*, 2011b). As possíveis desvantagens dos biocatalisadores, relacionadas à estabilidade operacional das lipases e reuso, são também negligenciadas no que tange os aspectos econômicos da rota biocatalítica. No caso dos reusos, ainda que boa parte dos estudos de síntese inclua uma avaliação deste tópico, não se conhecem profundamente os impactos da temperatura, da agitação, da carga de biocatalisador e do tempo de reação na capacidade de reuso no meio reacional. Uma análise econômica simplificada pode revelar a insuficiência do número de reusos que geralmente são reportados na literatura, dado que os custos de lipases imobilizadas orbitam entre 100 e 1000 USD kg⁻¹ e as cargas de biocatalisador orbitam entre 1 a 5% da massa dos reagentes. Tomando como exemplo o estudo publicado em Sousa e co-autores (2021) (Sousa *et al.*, 2021a), tem-se a síntese do éster

laurato de octila catalisada por Novozym 435 (1,5% m/m ácido), na qual se observam 4 reusos sem perda significativa de atividade para ciclos de 3 h; considerando que o valor de venda do laurato de octila é 5 USD kg⁻¹ e que o biocatalisador custa 1000 USD kg⁻¹, 4 lotes de 1 ton de produto consomem 9,8 kg de biocatalisador, de acordo com as condições reacionais ótimas alcançadas no estudo. Esta quantidade de produto pode auferir 20000 USD em receitas, carregando um custo de 9800 USD de biocatalisador (49% do valor de venda), mostrando o impacto da baixa capacidade de reuso para um biocatalisador de tão alto custo (Sousa *et al.*, 2021a; Tufvesson *et al.*, 2011a).

A avaliação das vantagens e desvantagens sob uma perspectiva econômica e apoiado em dados quantitativos é crucial para que as tecnologias desenvolvidas em laboratório sejam escalonadas e cheguem aos processos industriais. Estudos de viabilidade técnico-econômica de processos são o caminho seguro para o escalonamento de tecnologias. Um estudo de viabilidade técnico-econômico baseia-se no desenho (modelagem), mais ou menos detalhado, de um processo de produção com suas etapas, entradas e saídas em uma determinada escala de produção (Turton *et al.*, 2018). Esta modelagem pode ser feita com o auxílio de recursos computacionais em softwares comerciais de simulação de processos como o SuperPro Designer ou Aspen. O processo modelado e sua escala permitem obter uma estimativa do dimensionamento dos equipamentos, e, conseqüentemente, de seus custos de instalação, operação e mão-de-obra requerida. Definidas estas condicionantes, adotam-se premissas dos custos de entrada – custos de matérias-primas, custos de utilidades (energia elétrica, vapor, água de processo) e custos de mão-de-obra – e dos custos de saída – valor de venda do(s) produto(s). Com estas informações, então, é possível calcular uma estimativa dos custos de produção (OPEX) e de instalação (CAPEX) em uma determinada escala de produção e as receitas auferidas pela venda dos produtos. Ao comparar os custos com as receitas, os principais parâmetros econômicos de viabilidade podem ser estimados – valor presente líquido (NPV em inglês, ou VPL) e tempo de retorno do investimento (Towler e Sinnott, 2013). A Figura 8 apresenta esquematicamente o desenvolvimento de um estudo de viabilidade técnico-econômica a partir de modelagem e simulação de processos.

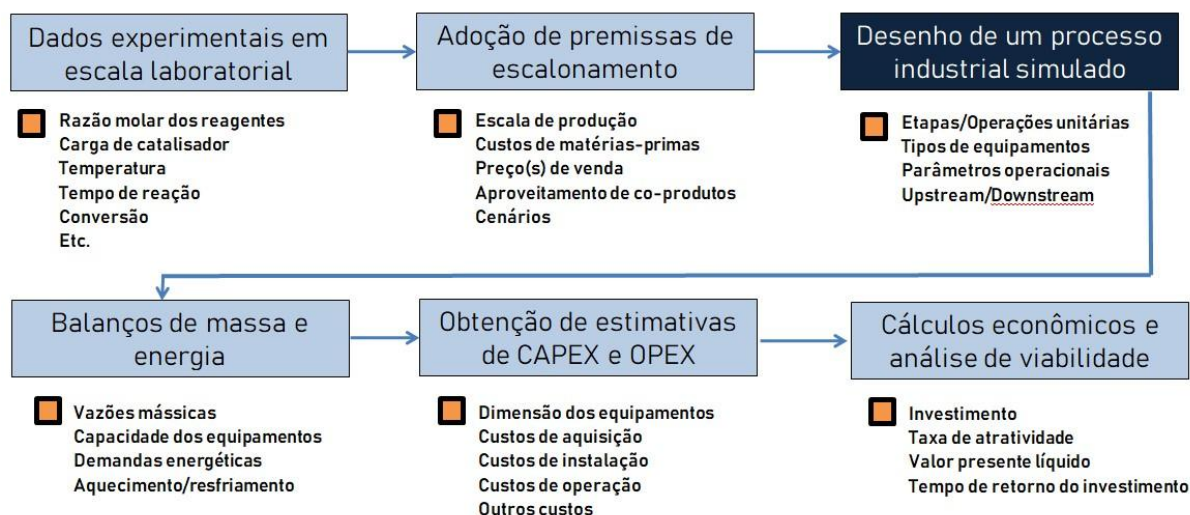


Figura 8: Estruturação de um estudo de viabilidade técnico-econômica a partir de modelagem e simulação de processos.

Estudos como este em um processo químico demandam o levantamento de um amplo conjunto de dados físico-químicos, para os balanços de massa e energia, e de dados de custos e valor de venda, para os cálculos que indicam viabilidade econômica ou não do processo. Ao passo que dados físico-químicos são amplamente disponíveis na literatura, o mesmo não se pode dizer a respeito de dados econômicos, que são de domínio privado por envolver relações de confidencialidade entre indústrias, fornecedores, distribuidores e consumidores finais. Ainda que seja possível contatar fornecedores de produtos químicos na *internet*, cotações não são enviadas apenas para consulta de um ente não-industrial/comercial ou para fins de pesquisa e desenvolvimento. Neste contexto, os dados econômicos apresentam considerável incerteza. O cálculo das receitas anuais de uma planta industrial depende da quantidade produzida e do valor de venda do produto neste tipo de análise; o cálculo do custo operacional depende, em grande parte, da quantidade de matéria-prima e do custo destas matérias-primas e, por fim, os cálculos para viabilidade dependem do balanço entre receitas e despesas. Apoiado sobre premissas de grande incerteza, os cálculos de viabilidade também carregam grande incerteza. Assim, é crucial adotar um cuidadoso processo de levantamento de dados/ou encontrar um parceiro industrial em estudo de caso específico, de modo a reduzir tanto quanto possível as incertezas econômicas.

3 JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

Muito se tem estudado sobre reações de esterificação catalisadas por lipases. Contudo, o diferencial desta proposta é produzir, em uma única etapa e dispensando o uso de solventes, ésteres de cadeia curta, média e longa úteis para diversos setores industriais aproveitando as vantagens da biocatálise e estudando estratégias que garantam a viabilidade técnico-econômica dessa rota. Sistemas multicompetitivos são adotados para o estudo da seletividade das lipases, mas até o momento, é inédita na literatura a aplicação deste conceito para o desenvolvimento de um processo biocatalítico de obtenção de ésteres usando lipases imobilizadas.

A utilização de reações em sistemas multicompetitivos vem de encontro a disponibilidade de resíduos/co-produtos agroindustriais ricos tanto em ácidos carboxílicos como em álcoois, visando seu melhor aproveitamento para produção de ésteres. Resíduos do refino de óleos vegetais, como os destilados de desodorização do óleo de palma e soja, óleos de fritura residuais, ou hidrolisados de óleos não-comestíveis são fontes de ácidos carboxílicos de cadeia média-longa com destinações de baixo valor agregado. Resíduos da produção do etanol e do açúcar, como o óleo fusel e/ou a vinhaça, são fontes de álcoois de cadeia curta e média, bem como os co-produtos da gaseificação da biomassa em sínteses de Fischer-Tropsch (Choudhury, Chakma e Moholkar, 2015). A combinação de resíduos ácidos e alcoólicos de diferentes tamanhos de cadeia, ou a utilização de um destes para reações com reagentes puros em sistema multicompetitivo, pode representar importante atributo econômico e ambiental.

Há na literatura consideráveis lacunas sobre estudos preliminares de viabilidade técnico-econômica e que avaliem detalhadamente as métricas de processo. Também são escassos estudos sobre escalonamento e comparação entre diferentes reatores no tópico de esterificação enzimática. A ausência destes estudos limita drasticamente a identificação dos gargalos dos processos biocatalíticos. Diferentemente do que se observa em estudos sobre biodiesel por via enzimática, a produção biocatalítica de outros ésteres tem recebido menor atenção sob as perspectivas tecnológicas e de processo industrial, apesar da grande relevância comercial.

No caso particular aqui estudado, o sistema multicompetitivo envolve a formação dos ésteres dos ácidos acético (C2), cáprico (C10) e oleico (C18) com etanol (C2) e *n*-octanol(C8), formando 6 ésteres de aplicações variadas como solventes, plastificantes, aromas, emolientes, emulsificantes e lubrificantes. Ao término da reação, estes ésteres podem ser separados e destinados cada um à sua aplicação específica. O acetato de etila formado na síntese aqui estudada, por exemplo, é um composto de grande interesse industrial, sendo um solvente verde muito útil no mercado de tintas e resinas, plásticos e indústria farmacêutica; sua obtenção por biocatálise tem potencial para acrescentar maior valor agregado a este, já que seria um produto verde obtido por um processo verde. Ésteres com propriedades flavorizantes, como é o caso do acetato de octila (aroma de laranja) e o caprato de etila (aroma de maçã), quando obtidos por rota biocatalítica podem ser rotulados como “naturais” ou “verdes” (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Khan e Rathod, 2015), atingindo nichos específicos de mercado. Os ésteres de cadeia média e longa, amplamente utilizados como emolientes em formulações cosméticas também pode se valer dos apelos mercadológicos de obtidos por processos verdes ou sustentáveis, com um nicho de público consumidor propenso a adquirir produtos com este apelo.

O sistema multicompetitivo estudado pretende provar o conceito em relação à obtenção simultânea de ésteres de cadeia curta, média e longa, a partir dos ácidos e álcoois citados acima. O estudo deste sistema multicompetitivo em reações catalisadas por lipases imobilizadas comerciais visa facilitar a compreensão dos fenômenos envolvidos e o estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica, já que há farta literatura sobre o comportamento destas lipases em diferentes meios reacionais e informações sobre seu custo no contexto industrial. Como os ésteres formados atendem aplicações de mercados diferentes, um eventual processo baseado nesta tecnologia demanda, obrigatoriamente, a separação destes por uma sequência de operações unitárias. Contudo, é possível também desenhar sistemas multicompetitivos que gerem misturas de ésteres que não demandem separação de todos os seus componentes, como pode ser o caso na indústria cosmética, que demanda ésteres de diferentes tamanhos de cadeia (ésteres de cadeia curta como fragrâncias e ésteres de cadeia média-longa como emoliente, umectante ou emulsificante), levando a potenciais produtos inovadores obtidos por processos verdes, o que traria um interessante apelo mercadológico.

4 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um processo biocatalítico com potencial viabilidade técnico-econômica para a obtenção de ésteres de cadeia curta, média e longa simultaneamente no mesmo meio reacional, sem solventes, por meio do uso de lipases imobilizadas.

4.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta tese foram:

- Comparar as conversões das reações em sistemas multicompetitivos (reação simultânea entre ácidos e álcoois de diferentes tamanhos de cadeia) em relação a síntese individual de cada éster (1 ácido e 1 álcool), utilizando um sistema multicompetitivo de esterificação dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol empregando lipases imobilizadas comerciais;
- Estudar as métricas de processo – conversão, concentração de produtos, produtividade volumétrica e produtividade catalítica – do sistema multicompetitivo em comparação com as reações individuais e dados de outras sínteses de ésteres descritas na literatura;
- Estudar o reuso do biocatalisador no processo;
- Melhorar o desempenho dos parâmetros reacionais mais relevantes para incremento das métricas de processo e desenvolver um protótipo de reator de coluna de bolhas para a síntese de ésteres em sistema multicompetitivo;
- Modelar e simular um processo industrial baseado no processo desenvolvido com apoio de ferramentas computacionais;
- Avaliar preliminarmente a viabilidade técnico-econômica dos diferentes cenários estudados na simulação, identificando eventuais gargalos do processo.

5. METODOLOGIA

Esta tese dividiu-se em três etapas, conforme mostrado na Figura 10: a primeira, visando comprovar que as reações simultâneas entre vários ácidos e vários álcoois (cadeia curta, média e longa) podem atingir conversões mais altas que reações individuais entre um

ácido e um álcool (particularmente os de cadeia curta) em meios sem solvente, investigando os aspectos principais da reação e do comportamento das lipases imobilizadas nestes meios; a segunda, estudar as métricas de processo e estratégias para atingir as condições reacionais mais favoráveis dos parâmetros reacionais (razão molar ácidos:álcoois, tempo de reação, reuso do biocatalisador); e a terceira etapa visando a modelagem e simulação de um processo baseado na tecnologia desenvolvida e a avaliação técnico-econômica preliminar deste processo. Para fins deste trabalho, consideram-se reagentes/produtos de cadeia curta aqueles com tamanho de cadeia inferiores a 8 carbonos e de cadeia média/longa aqueles com tamanho de cadeia superiores a 8 carbonos.

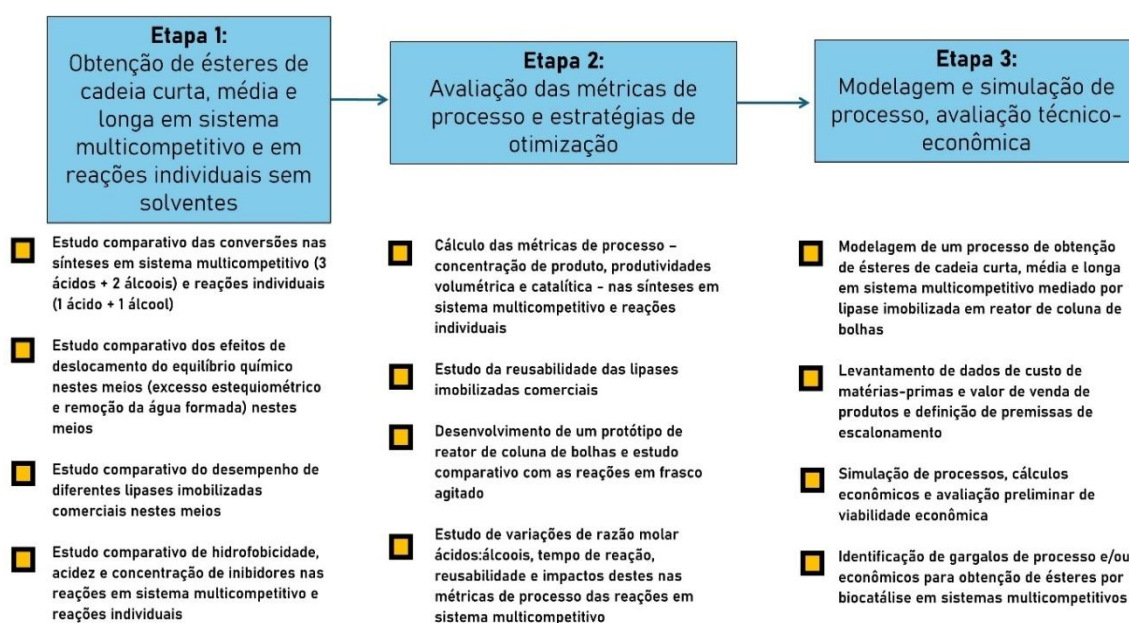


Figura 9: Etapas conceituais da tese.

5.1 Reagentes e enzimas

Ácido cáprico, ácido oleico, ácido nonanóico, ácido palmítico, *n*-octanol, *n*-pentanol, acetato de etila e peneira molecular 3 Å foram adquiridos da Merck S/A; ácido acético, etanol, isobutanol e hidróxido de potássio foram adquiridos da Synth. Todos os reagentes são de grau analítico (P.A.). As lipases imobilizadas Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TLIM foram gentilmente doadas por Novozymes Latin America.

5.2 Reações de esterificação em frasco agitado e em reator de coluna de bolhas

Dois tipos distintos de reações de esterificação catalisadas por lipase imobilizada foram estudados: reações entre um ácido e um álcool (chamadas neste texto de reações individuais) e reações entre uma mistura de ácidos e uma mistura de álcoois (chamadas neste texto de reações em sistema multicompetitivo).

Para as reações individuais, a metodologia de síntese se deu a partir da pesagem em balança analítica de uma massa apropriada de apenas um ácido (ácido acético ou ácido cáprico ou ácido oleico) e apenas um álcool (etanol ou *n*-octanol) em Erlenmeyers de 50 mL com tampa. Reações individuais típicas partiram de quantidade equivalente a 0,01 mol de cada ácido. Contudo, variações nas quantidades em mol de ácido foram adotadas para os reagentes de menor massa molecular (ácido acético ou etanol) para manter o volume reacional total entre 3 e 3,5 mL. Testes comparativos com volumes reacionais maiores (10 e 15 mL) foram realizados, identificando que não houve diferença estatisticamente significativa (ANOVA $p < 0,05$) entre os resultados de conversão da mesma síntese. As reações individuais foram estudadas em duas condições de razão molar ácidos:álcoois: 1:1 (equimolar) e 1:2 (excesso estequiométrico do álcool), em temperatura fixa de 50 °C, agitação orbital constante de 200 rpm em shaker, e carga de biocatalisador fixa em 100 U de atividade de esterificação (determinada experimentalmente, vide subitem 5.1.5) para os três biocatalisadores testados – Novozym 435 ou Lipozyme RM IM ou Lipozyme TL IM. Nas reações em condição equimolar e excesso estequiométrico também foi adicionada peneira molecular 3Å (Merck) (30% m/m total) para absorção da água formada na síntese. Desta forma, quatro condições reacionais foram avaliadas: 1:1 sem peneira molecular (1:1 sp), 1:1 com peneira molecular (1:1 cp), 1:2 sem peneira molecular (1:2 sp) e 1:2 com peneira molecular (1:2 cp).

Para as reações em sistema multicompetitivo, as sínteses se deram a partir da pesagem em balança analítica de uma massa apropriada da mistura dos ácidos (ácido acético, ácido cáprico e ácido oleico) e da mistura dos álcoois (etanol e *n*-octanol) em Erlenmeyers de 50 mL com tampa. Reações típicas em sistema multicompetitivo partiram de quantidade equivalente a 0,01 mol da mistura ácida, dividida igualmente por cada ácido (0,00333 mol de ácido acético + 0,00333 mol de ácido cáprico + 0,00333 mol de ácido oleico); a mesma divisão aconteceu em cada álcool estudado (por exemplo: 0,01 mol de mistura alcoólica corresponde a 0,005 mol de etanol e 0,005 mol *n*-octanol). O meio reacional contendo as

misturas ácida e alcoólica acima descritas possui volume reacional de aproximadamente 3 mL. As reações multicompetitivas foram estudadas em condições de razão molar ácidos:álcoois: 1:1 (equimolar), 1:2 (excesso estequiométrico da mistura alcoólica) e em razões molares intermediárias a estas (1:1,1, 1:1,2, etc.) e carga de biocatalisador 100 U para os três biocatalisadores testados – Novozym 435 ou Lipozyme RM IM ou Lipozyme TL IM. De forma análoga às reações individuais, também foram testadas reações na presença de peneira molecular, utilizando as mesmas notações citadas acima – 1:1 sp, 1:1 cp, 1:2 sp e 1:2 cp.

Visando melhorar o desempenho geral da síntese dos ésteres em sistemas multicompetitivos, os diferentes ácidos e álcoois foram misturados em um protótipo de reator de coluna de bolhas, mantendo o volume reacional no mesmo nível do estudado no frasco agitado (cerca de 3 mL). O reator consiste em uma coluna vertical de vidro, com relação diâmetro x altura 1:4 e volume útil de 30 mL. Na base desta coluna é injetado ar comprimido através de uma bomba de deslocamento positivo de ar. Este gás é dispersado por meio de uma placa de vidro sinterizado, de diâmetro igual ao da coluna do reator, com diâmetro de poro inferior a 20 μm . No topo da coluna foi acoplado um leito fixo de peneira molecular 3 Å, que absorve a água formada no meio reacional carregada pelas bolhas de ar. Este protótipo de reator foi construído em vidro dentro de um frasco cilíndrico de mesma altura, no qual foi adicionado água mantida à temperatura constante, conforme Figura 13. Tanto as reações em frasco agitado quanto em reator de coluna de bolhas foram realizadas em batelada.

Os tempos de reação estudados variaram de 2 a 24 horas de reação, dependendo da carga de biocatalisador adotada e do tópico estudado. Considera-se que as reações chegaram ao término quando o índice de acidez do meio permanece inalterado, com o atingimento do equilíbrio químico da esterificação.

Reações controle, sem a presença de biocatalisador foram realizadas misturando-se os reagentes (reações individuais ou reações multicompetitivas) em condição equimolar à 50 °C, para certificar que os reagentes não reagem sem a presença do biocatalisador nos intervalos estudados (até 24 h).

5.3 Análises quantitativas – índice de acidez e cromatografia gasosa

As reações de esterificação, tanto individuais quanto em sistema multicompetitivo, foram monitoradas em intervalos periódicos por meio da determinação do índice de acidez (IA). O índice de acidez mede, através da titulação dos ácidos com uma base forte, a

concentração dos ácidos presentes. A redução do índice de acidez ao longo da reação, então, representa a conversão dos ácidos. Como é sabido que lipases imobilizadas são catalisadores de alta especificidade, admite-se que a conversão dos ácidos se dá apenas em ésteres, sem formação de subprodutos. Desta forma, o acompanhamento da redução do índice de acidez do meio é uma medida indireta da conversão dos ácidos e do rendimento da reação.

A determinação do índice de acidez foi realizada por titulação ácido-base com hidróxido de potássio (KOH) 0,008 M, de acordo com o descrito em trabalhos anteriores do grupo (Sousa *et al.*, 2020). Alíquotas de 60 µL foram retiradas do meio reacional e pesadas em balança analítica. Após pesagem, foram dissolvidas em 5 mL de etanol 95%, com a adição de 5 gotas do indicador fenolftaleína. Sob agitação magnética, o frasco com a alíquota dissolvida foi titulado até viragem do indicador (de incolor para róseo). O volume de KOH gasto e a massa da amostra foram empregados para se obter o índice de acidez a cada ponto, de acordo com os cálculos descritos na metodologia da American Oil Chemical Society (AOCS) Cd 3d-63, conforme Equação 9:

$$\text{Eq. 9} \quad IA = \frac{V_{KOH} \times [KOH] \times 56,1}{m_{amostra}}$$

Na qual IA é o índice de acidez (% em massa), V_{KOH} é o volume de KOH consumido na titulação (mL), $[KOH]$ é a concentração molar da solução de KOH (mol L^{-1}), 56,1 é a massa molecular de KOH (g mol^{-1}) e “m” é a massa da amostra (g).

O cálculo da conversão dos ácidos é baseado na redução do índice de acidez em um dado intervalo de tempo (por exemplo, entre o início e o fim da reação), conforme mostrado na Equação 10:

$$\text{Eq. 10} \quad \text{Conversão (\%)} = 100 - \left[\left(\frac{IA_f}{IA_i} \right) \times 100 \right]$$

Onde IA_f é o índice de acidez no final da reação de esterificação e IA_i é o índice de acidez no início da reação. As análises foram realizadas tipicamente em duplicata.

A determinação das concentrações de cada produto formado se deu por cromatografia gasosa. Utilizou-se um cromatógrafo em fase gasosa Agilent 7890B com injetor automático, equipado com detector de ionização de chama (FID). As metodologias de separação e quantificação dos ésteres foi desenvolvida com a coluna capilar SupelcoWax10 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), de polietilenoglicol modificado, de dimensões 30 m x 0,53

mm x 0,25 μm , utilizando nitrogênio (N_2) ultrapuro como gás de arraste. As amostras foram analisadas sem derivatização por diluição em isobutanol. Devido às diferentes faixas de concentração dos analitos presentes na amostra e visando a melhor resolução dos picos cromatográficos, métodos específicos para os diferentes tamanhos de cadeia dos analitos – curta, média ou longa – foram adotados. Notas de aplicação constantes no banco de dados ScanView, software de apoio disponibilizado pela Agilent em seu website (“Scanview Application 2025”, 2025), serviram como base para definição das condições das corridas cromatográficas.

Para os analitos de cadeia curta – etanol, *n*-octanol, acetato de etila e acetato de octila, as condições estabelecidas do método foram: temperatura inicial do forno de 45 °C, sendo mantida por 2 minutos e então aquecida a 5 °C min^{-1} até 60 °C, mantida por 2 minutos e novamente aquecida até 150 °C a 5 °C min^{-1} . Esta temperatura foi mantida por 4 minutos e aquecida até 250 °C sob taxa de 20 °C min^{-1} e mantida nesta temperatura por mais 1 minuto, totalizando o tempo de análise em 29 minutos. O fluxo do gás de arraste foi de 10 mL/min, injeção em modo *Split* 2:1 e volume de injeção 1 μL , e as temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 250 °C e 280 °C, respectivamente. As faixas utilizadas para a construção das curvas analíticas foram de 0 a 5000 ppm de cada analito. Acetato de etila grau espectroscópico foi utilizado para a curva analítica. Já o padrão para a curva analítica do acetato de octila foi sintetizado em laboratório, por meio de reação entre o ácido acético e *n*-octanol nas seguintes condições: razão molar ácido:álcool 1:2, 50 °C, 200 rpm de agitação, com 1,3% (m/m total dos substratos) de carga de biocatalisador Novozym 435, com 30% (m/m total dos substratos) de peneira molecular 3Å para remoção da água formada, por 1 hora de reação. Por meio do cálculo da conversão obtido com o índice de acidez, determinou-se que este padrão continha 185,2 g L^{-1} de acetato de *n*-octila, equivalente a uma conversão de 40,1% do ácido acético após 1 h de reação.

Para os analitos de cadeia média/longa – caprato de etila e caprato de octila – as condições estabelecidas foram: temperatura inicial do forno de 45 °C, sendo mantida por 1 minuto e então aquecida a 5 °C min^{-1} até 65 °C, mantida por 1 minuto e aquecida até 120 °C a 25 °C min^{-1} . Por fim, foi novamente aquecida até 200 °C sob taxa de 5 °C/min, totalizando o tempo de análise de 24 minutos. As demais condições foram idênticas ao método anterior, com exceção do volume de amostra injetado (0,3 μL). As faixas utilizadas para a construção das curvas analíticas foram de 0 a 5000 ppm de cada analito. Os padrões de caprato de etila e caprato de octila foram sintetizados no laboratório, por meio de reação entre os respectivos ácidos e álcoois nas seguintes condições razão molar ácido:álcool 1:1, 50 °C, 200 rpm de

agitação, com 1,3% (m/m total dos substratos) de carga de biocatalisador Novozym 435, com 30% (m/m total dos substratos) de peneira molecular 3Å para remoção da água formada, por 1 hora de reação. Por meio do cálculo da conversão obtido com o índice de acidez, determinou-se que estes padrões continham, respectivamente, 603,2 g L⁻¹ de caprato de etila e 671,7 g L⁻¹ de caprato de octila, equivalente a conversões de 76,1% e 83,0% do ácido cáprico, respectivamente, após 1 h de reação.

Para os analitos de cadeia longa – oleato de etila e oleato de octila - as condições estabelecidas foram: temperatura inicial do forno de 45 °C, sendo mantida por 1 minuto e então aquecida a 5 °C min⁻¹ até 65 °C, mantida por 1 minuto e novamente aquecida até 250 °C a 50 °C min⁻¹. Esta temperatura foi mantida por 20 minutos, totalizando o tempo de análise de 26 minutos. As demais condições foram idênticas ao método para ésteres de cadeia curta, com exceção do volume de amostra injetado (0,3 µL). As faixas utilizadas para a construção das curvas analíticas foram de 0 a 5000 ppm de cada analito. Os padrões de oleato de etila e oleato de octila foram sintetizados no laboratório, por meio de reação entre os respectivos ácidos e álcoois nas seguintes condições razão molar ácido:álcool 1:1, 50 °C, 200 rpm de agitação, com 1,3% (m/m total dos substratos) de carga de biocatalisador Novozym 435, com 30% (m/m total dos substratos) de peneira molecular 3Å para remoção da água formada, por 1 hora de reação. Por meio do cálculo da conversão obtido com o índice de acidez, determinou-se que estes padrões continham, respectivamente, 532,1 g L⁻¹ de oleato de etila e 523,4 g L⁻¹ de oleato de octila, equivalente a conversões de 64,5% e 62,9% do ácido oleico, respectivamente, após 1 h de reação.

A Figura 10 compila as metodologias reacionais e analíticas adotadas ao longo deste estudo.

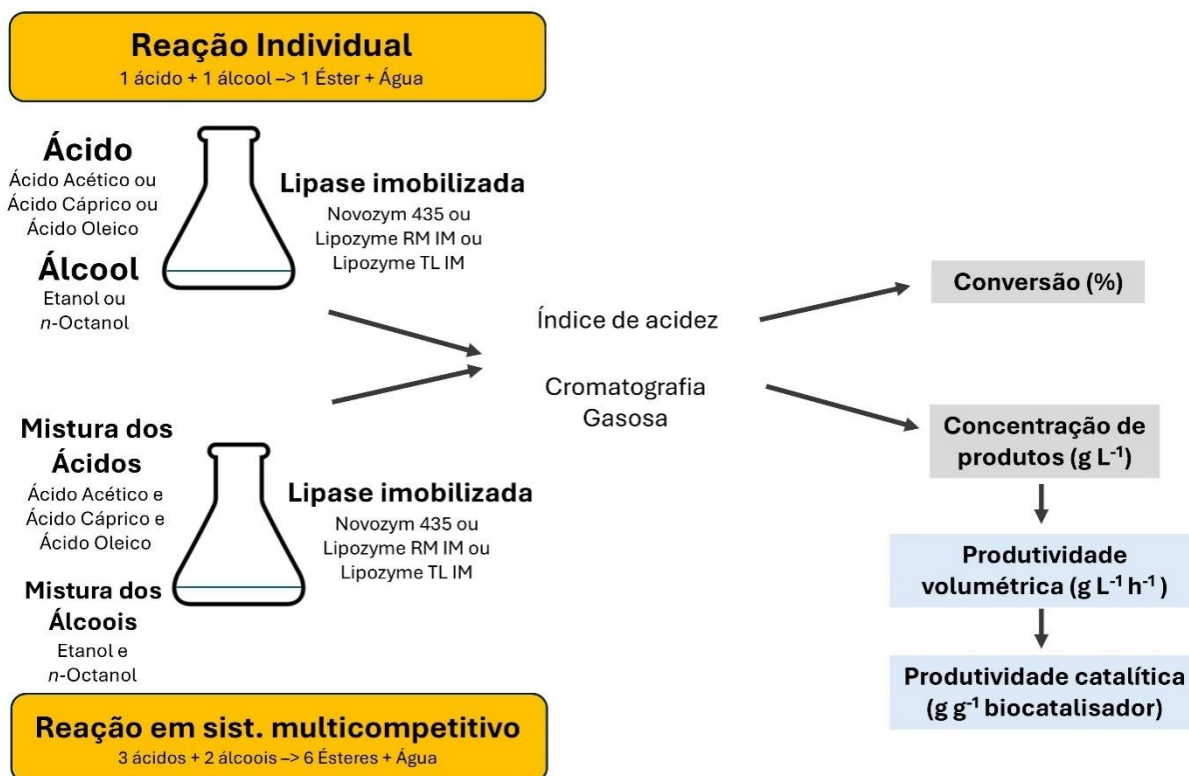


Figura 10: Metodologias reacionais e analíticas principais da tese.

5.4 Caracterização dos ésteres formados

A identificação dos produtos formados nas reações multicompetitivas foi realizada pela técnica de espectrometria de massas (MS) acoplada ao cromatógrafo em fase gasosa. As amostras foram separadas por meio de cromatografia gasosa, utilizando-se um cromatógrafo Shimadzu CGMS QP2010 SE incluindo um auto-amostrador AOC-20i, com detecção por espectrometria de massas quadrupolar. A separação dos analitos se deu por meio de uma coluna capilar Quadrex DB-5 MS (5% difenil-dimetilsiloxano, 30,0 m × 0,25 mm, 0,25 μm). Tal como nas análises quantitativas, os ésteres de cadeia curta, média e longa foram separados para identificação em 3 programações de aquecimento do forno da coluna diferentes, tendo todos eles temperatura de injeção de 250 °C em modo split e utilizando He como gás de arraste. Para ésteres de cadeia curta, utilizou-se a seguinte programação de temperatura do forno: temperatura inicial do forno de 45 °C, sendo mantida por 2 minutos e então aquecida a 5 °C min⁻¹ até 60 °C, mantida por 2 minutos e aquecida até 150 °C a 5 °C min⁻¹, sendo mantida neste patamar por mais 4 minutos. Por fim, foi novamente aquecida até 250 °C sob taxa de 20 °C min⁻¹ e mantida assim por 1 minuto. Para ésteres de cadeia média-longa, utilizou-se a seguinte programação de temperatura do forno: temperatura inicial do forno de

45 °C, sendo mantida por 1 minuto e então aquecida à 5 °C min⁻¹ até 60 °C, mantida por 1 minuto e aquecida até 120 °C a 25 °C min⁻¹ e novamente aquecida até 200 °C sob taxa de 5 °C min⁻¹ e mantida assim por 1 minuto. Para ésteres de cadeia longa, utilizou-se a seguinte programação de temperatura do forno: temperatura inicial do forno de 45 °C, sendo mantida por 1 minuto e então aquecida à 5 °C min⁻¹ até 60 °C, mantida por 1 minuto e aquecida até 250 °C a 50 °C min⁻¹ e mantida neste patamar por 20 minutos.

O detector de espectrometria de massas foi operado pela técnica de ionização por impacto de elétrons a 70 eV, e a varredura se deu na faixa de 40 a 500 m/z. Os produtos foram identificados comparando os espectros de massa obtidos com os espectros da biblioteca do NIST – *National Institute of Standard and Technology* (EUA) – versão 5. As identificações nas reações em sistema multicompetitivo que não coincidiram com os ésteres teoricamente esperados foram confirmadas com análises das amostras de reações individuais e/ou dos reagentes puros.

5.5 Determinação da atividade enzimática

As atividades enzimáticas de esterificação (U g⁻¹) foram determinadas para lipases imobilizadas comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, a partir da reação entre ácido oleico e etanol em condição equimolar (1:1) conforme descrito no trabalho de Sousa e co-autores (2021) (Sousa *et al.*, 2021a) com modificações. As reações para determinação da atividade foram conduzidas em temperatura de 40 °C, partindo-se de 0,0142 mol de ácido oleico (4 g), adicionando-se quantidade fixa de 0,1 g de cada biocatalisador. A análise do progresso da reação se deu por titulação ácido-base do meio reacional ao longo de intervalos curtos de reação (0, 5, 10, 20 e 30 minutos), no qual uma alíquota do meio reacional (100 µL) é retirada do meio reacional em duplicata. As alíquotas foram diluídas em etanol 95% e adicionadas 5 gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi realizada com solução NaOH 0,02 M. O volume gasto de NaOH foi registrado e utilizado para o cálculo da atividade enzimática de esterificação, conforme Eq. 11. Uma unidade de atividade enzimática (1 U) é definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de oleato de etila por minuto.

Eq. 11

$$U\ g^{-1} = \frac{(V_0 - V_t)_{NaOH} \times [NaOH] \times 1000 \times V_{reação}}{t \times m_{enz} \times V_{aliqu}}$$

Na qual “ $(V_0 - V_t)_{\text{NaOH}}$ ” é a diferença do volume de NaOH gasto para titular o meio reacional antes da adição do biocatalisador e o volume de NaOH gasto na titulação em determinado intervalo de tempo da reação (mL), “[NaOH]” é a concentração molar da solução de NaOH (mol L^{-1}), $V_{\text{reação}}$ é o volume total do meio reacional (mL); t é o tempo de reação (min), m_{enz} é a massa de biocatalisador utilizada na determinação (g) e V_{aliqu} é o volume da alíquota coletada para a titulação (μL).

5.6 Estudo do reuso do(s) biocatalisador(es)

Para avaliar o reuso dos biocatalisadores estudados, uma sequência de reações de esterificação foi avaliada, nas quais a mesma carga de biocatalisador foi mantida no frasco/reator de coluna de bolhas. Escolhidas as condições reacionais a serem estudadas – temperatura, razão molar, carga de biocatalisador, velocidade de agitação, esquema reacional e biocatalisador adotado – estas foram mantidas constantes em toda a sequência de reações para o estudo de reuso. Os reagentes e o biocatalisador foram adicionados ao frasco de reação para o primeiro ciclo de reações sequenciais e, após o término da reação, o conteúdo líquido do frasco foi retirado cuidadosamente com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e descartado. O biocatalisador da reação foi mantido no fundo do frasco sem nenhum tratamento posterior e um novo meio reacional (ácido(s) e álcool(is)) foi adicionado ao frasco/reator para início de um novo ciclo nas mesmas condições. A prática de manter o biocatalisador sem lavagem no frasco visou estudar a capacidade de reuso em relação ao número de horas de operação que o biocatalisador consegue manter o mesmo nível de atividade no reator. As reações sequenciais foram monitoradas pela redução do índice de acidez do meio; a sequência de reações é encerrada quando se observam variações negativas superiores a 10% da conversão observada no primeiro ciclo de reação. Assim, se uma dada reação de esterificação apresenta conversão de 90% dos ácidos e após 5 reações sequenciais, com o mesmo biocatalisador sendo reutilizado, a conversão cai a 75%, considera-se que este biocatalisador pode ser reusado 5 vezes na mesma condição reacional.

5.7 Cálculo das métricas de processo

O desempenho geral das reações individuais e em sistema multicompetitivo foi avaliado através das métricas de processo, também chamados de indicadores chave de

desempenho (*Key Performance Indicators* – KPI) na literatura de engenharia química. As avaliações incluíram os seguintes parâmetros: conversão da reação (equivalente a conversão dos ácidos, considerando a especificidade catalítica das lipases que não leva à formação de produtos de reações paralelas), produtividade catalítica, produtividade volumétrica (*Space-Time Yield* – STY) e concentração de produto. As concentrações de produto(s) foram determinadas por meio de cromatografia gasosa, conforme descrito no subitem 5.3, ou a partir de cálculos estequiométricos, conforme mostrado na Figura 11. Os cálculos das métricas foram feitos conforme apresentado na Figura 6 e utilizados para comparação entre as reações individuais e as em sistema multicompetitivo, ou entre diferentes condições das reações em sistemamulticompetitivo.

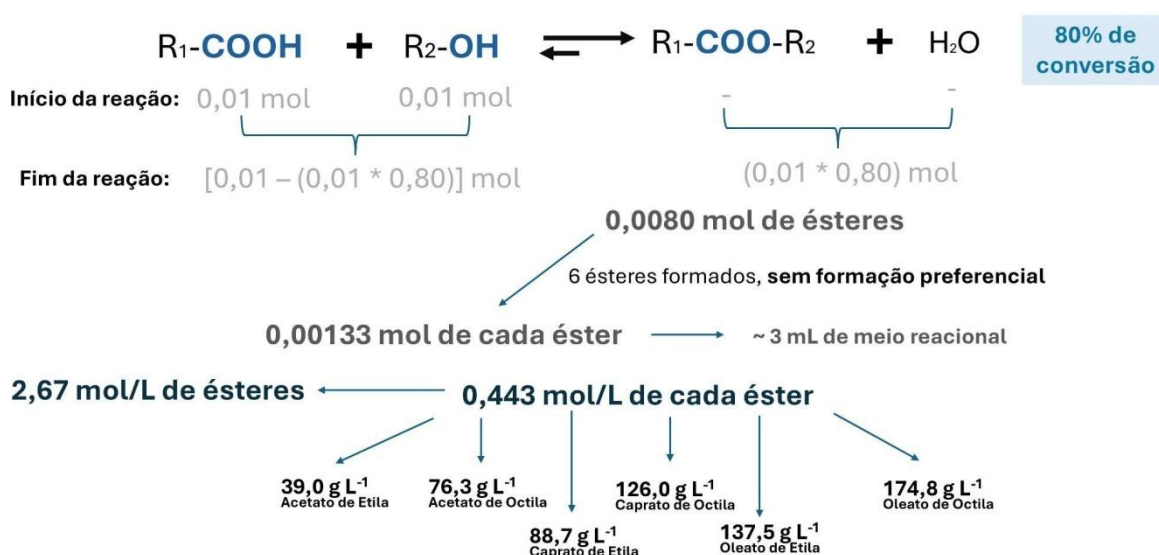


Figura 11. Exemplo de cálculo estequiométrico da concentração de produtos em sistema multicompetitivo.

5.8 Modelagem, simulação de processos e estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica

Após a consolidação dos parâmetros reacionais considerados mais favoráveis para a síntese dos ésteres de cadeia curta, média e longa em sistema multicompetitivo, um processo de produção em escala industrial foi desenhado com o auxílio do software comercial SuperPro[®] Designer (v.13, Intelligen Co., Estados Unidos). Como premissa geral e simplificação, foi considerado que os resultados obtidos em escala laboratorial se manteriam

os mesmos com o aumento de escala de produção. O modelo de processo incluiu as etapas anteriores (*upstream*) e posteriores (*downstream*) à reação. O diagrama de fluxo de processo apresentado na Figura 12 mostra a modelagem do processo. As operações unitárias de evaporação *flash* e destilação foram modeladas com o auxílio do software ChemSep (v. 8, Harry Kooijman & Ross Taylor, Estados Unidos), utilizando os modelos de equilíbrio termodinâmico Gamma-Phi, equações de estado de Redlich-Kwong (1949) e modelo de coeficientes de atividade termodinâmica UNIFAC (1975), considerando a indisponibilidade na literatura de acesso aberto de todos os parâmetros termodinâmicos dos 6 ésteres formados no sistema multicompetitivo estudado necessários para os cálculos.

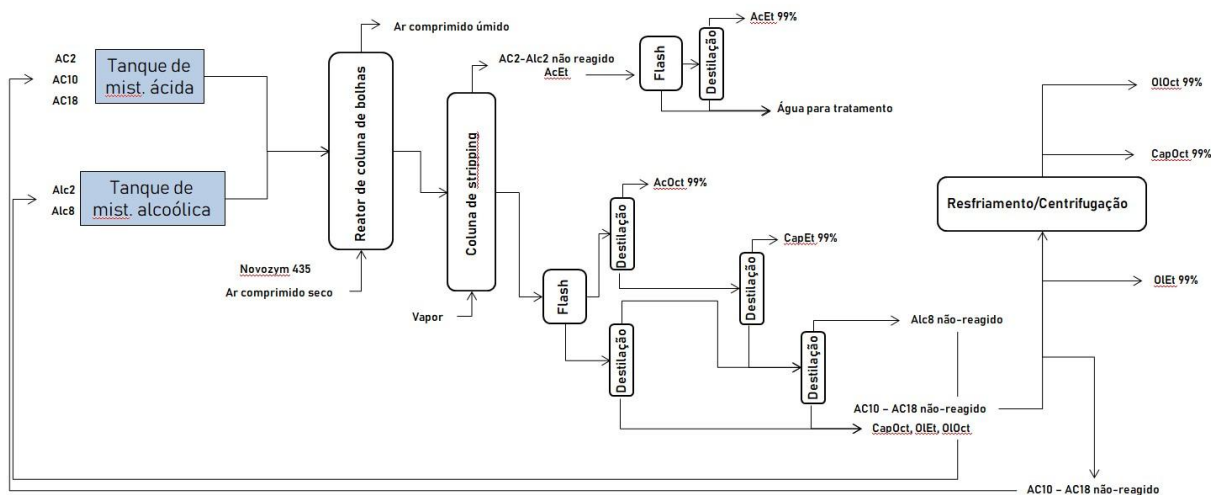


Figura 12. Diagrama simplificado de fluxo de processo para obtenção biocatalítica de acetato de etila, acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila em sistema multicompetitivo em reator de coluna de bolhas com Novozym 435.

Os fluxos de entrada de materiais e insumos foram estimados tendo por base as quantidades utilizadas em laboratório, adotando-se um conjunto de premissas detalhadas nas Tabela 12 e 13. Neste trabalho, buscou-se encontrar dados de custo de matérias-primas e produtos finais em quantidades industriais (embalagens de no mínimo 25 kg/litros). As fontes de pesquisa foram sites de comercialização de produtos químicos e ingredientes para aplicações específicas (p.ex: cosméticos) e sites com informações sobre comércio exterior. Quando os dados de comércio exterior encontrados referiam-se a valores anteriores a 2022, foi feita uma correção do valor pela inflação norte-americana, utilizando-se a ferramenta online *US Inflation Calculator* (US INFLATION CALCULATOR, 2019). E, por fim, na ausência destes, buscou-se os dados de custos em catálogos laboratoriais, divididos por um

fator de 10, conforme proposto no trabalho de Tüfvesson et al., 2011 (Tufvesson *et al.*, 2011a).

Os dados de custo de utilidades – vapor, energia elétrica e água de processo – foram levantados a partir de outros estudos de análise técnico-econômico disponíveis na literatura. Os dados foram compilados em uma planilha e padronizados na mesma unidade de medida. A média destes foi utilizada na modelagem e simulação deste estudo. Os dados disponíveis na base de dados do SuperPro Designer também foram incluídos nesta compilação, conforme a Tabela 13. Os dados de energia elétrica industrial no contexto brasileiro foram obtidos da Câmara de Comércio de Energia Elétrica (CCEE).

Os dados de custo de mão-de-obra foram feitos com base no contexto brasileiro, utilizando dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) de remuneração da mão-de-obra assalariada no país para diferentes profissões em 2024 e dados da Associação Brasileira da Indústria Química (ABIQUM).

Tabela 12: Custos de matérias-primas e valor de venda dos produtos para modelagem e simulação do processo de obtenção biocatalítica de ésteres dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol em sistema multicompetitivo

| | Qtde. industriais (USD kg ⁻¹) | Qtde. laboratoriais (USD kg ⁻¹) | Média (USD kg ⁻¹) |
|--------------------|---|---|----------------------------------|
| Ácido Acético | 1,2 ^{[a], [b], [c]} | - | 1,2 |
| Ácido Cáprico | 3,0 ^{[b], [d]} | - | 3,0 |
| Ácido Oleico | 3,2 ^{[a], [b], [c]} | - | 3,2 |
| Etanol | 0,4 ^[e] | - | 0,4 |
| <i>n</i> -Octanol | 3,3 ^{[b], [c]} | 5,7 ^{[f], [g]} | 4,5 |
| Acetato de Etila | 3,5 ^{[a], [b], [h]} | - | 3,5 |
| Acetato de Octila | 13,1 ^{[b], [c], [f]} | 13,5 ^{[f], [g]} | 13,3 |
| Caprato de Etila | 5,1 ^{[b], [c], [f]} | 9,4 ^[f] | 7,2 |
| Caprato de Octila | 9,0 ^{[c], [i]} | 4,3 ^{[j], [k]} | 6,7 |
| Oleato de Etila | 3,2 ^{[b], [c]} | 12,5 ^{[f], [g]} | 7,8 |
| Palmitato de Etila | 5,0 ^[c] | 7,7 ^[a] | 6,3 |
| Oleato de Octila | 20,0 ^[c] | 13,0 ^[l] | 16,5 |
| Novozym 435 | 924,0 ^[b] | - | 924,0 |

Fontes:

[a] ChemCentral: (“Chemical Distribution and Ingredient Supplier | ChemCentral Marketplace | ChemCentral.com”, 2025)

- [b] Zaubat: (“Import Export Data | Zaubat”, 2021)
 [c] Made in China: (MADE-IN-CHINA, 2019)
 [d] AliBaba: (ALIBABA, 2025)
 [e] USP/ESALQ/CEPEA: (IMAGENET TECNOLOGIA, 2025)
 [f] Chemical Book: (CHEMICALBOOK, 2016)
 [g] Sigma-Aldrich: (“Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services.”, 2016)
 [h] Pochteca Chemical: (“Pochteca Coremal - Distribuidora de Produtos Químicos”, [s.d.])
 [i] World of Aromas: (“World of Aromas”, 2025)
 [j] ASECHEM: (ASESCHEM, 2024)
 [k] Formulator Samples Shop: (“Formulator Samples Shop”, 2025)
 [l] Global Labor: (“Global Labor”, 2025)

Tabela 13: Itens de custo operacional e premissas técnicas/econômicas para modelagem e simulação do processo para obtenção biocatalítica de ésteres dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol em sistema multicompetitivo

| Item | Valor (unidade) |
|----------------------------|-----------------------------|
| Mão-de-obra h/h | 6 (USD h ⁻¹) |
| Vapor (média pressão) | 15 (USD ton ⁻¹) |
| Vapor (alta pressão) | 20 (USD ton ⁻¹) |
| Energia elétrica | 90 USD MWh |
| Água de processo | 0,10 USD m ⁻³ |
| Água de refrigeração | 0,50 USD m ⁻³ |
| Salmoura para refrigeração | 0,80 USD m ⁻³ |
| Modo de operação | Contínuo |
| Operação da planta | 7920 (h ano ⁻¹) |
| Tempo do projeto | 15 (anos) |
| Taxa de atratividade | 7 (%) |
| Taxa de depreciação | 10 (%) |
| Impostos | 40 (%) |

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Prova de conceito e investigação de hipóteses - comparação entre reações individuais e sistema multicompetitivo na síntese biocatalítica de ésteres utilizando lipases imobilizadas

A primeira questão a ser respondida neste estudo se refere à comparação entre a eficiência das reações individuais de 1 ácido e 1 álcool e as reações em sistema multicompetitivo. A eficiência do sistema em questão aqui é entendida e avaliada de forma ampla, englobando as taxas reacionais (conversão dos ácidos em ésteres e sua variação ao longo do tempo), as métricas de processo (concentração de produto, produtividade catalítica, produtividade volumétrica), reuso e questões econômicas.

Para responder a esta pergunta, é necessário avaliar as conversões atingidas pelas reações individuais e compará-las com as conversões alcançadas pelas reações multicompetitivas no mesmo intervalo de tempo. Além disso, é preciso identificar a extensão dos efeitos de deslocamento de equilíbrio, quer seja pelo excesso estequiométrico de um dos reagentes, quer seja pela remoção de um dos produtos da reação, nas conversões das reações nos dois sistemas avaliados. O interesse por esse aspecto decorre de que as reações com os reagentes de cadeia longa (mais hidrofóbicos) tendem a depender menos de estratégias de deslocamento do equilíbrio para atingir altas conversões do que as com reagentes de cadeia curta (menos hidrofóbicos), conforme demonstrado amplamente na literatura (Gawas, Jadhav e Rathod, 2016; Ghamgui, Karra-Chaabouni e Gargouri, 2004; Martinez-Garcia *et al.*, 2024; Sandoval, Marty e Condoret, 2001; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2023b; Sousa *et al.*, 2021c; Yadav e Thorat, 2012).

Neste sentido, avaliaram-se as reações individuais em condição equimolar (razão molar ácido:álcool 1:1) e excesso estequiométrico do álcool (razão molar ácido:álcool 1:2), na ausência ou na presença de peneira molecular para absorção da água formada na esterificação, com os biocatalisadores listados na Tabela 14. Estes experimentos foram realizados em reações sem solvente, catalisadas pelos três biocatalisadores comerciais testados, cujos resultados de conversão estão apresentados na Tabela 15. A temperatura de síntese nesse conjunto de experimentos foi padronizada em 50 °C, por ser uma temperatura que engloba a faixa ótima dos três biocatalisadores testados, e também pela discreta influência das variações de temperaturas na constante de equilíbrio da reação dentro deste contexto (Flores *et al.*,

2000; Sandoval *et al.*, 2002). A carga de biocatalisador nestes estudos foi padronizada em 100 U para todos os biocatalisadores testados. Considerando os dados de atividade enzimática de esterificação da Tabela 14, temos a carga de biocatalisador mássica (em relação a massa total dos substratos) de 1,3% de Novozym 435, 1,4% para Lipozyme RM IM e 2,4% para Lipozyme TL IM. A padronização por atividade enzimática iguala a comparação entre a quantidade de enzimas ativas no meio reacional, contudo, acarreta diferentes teores de sólidos no meio. Isto, por sua vez, pode exercer alguma influência no equilíbrio químico da reação devido à interação destes materiais com a água formada na reação (Colombié *et al.*, 1998; Sandoval *et al.*, 2002; Solaesa *et al.*, 2016; Sousa *et al.*, 2021b), já que os suportes de imobilização da Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM tem relativa hidrofilicidade (Jenab *et al.*, 2014; Solaesa *et al.*, 2016).

A carga de peneira molecular 3Å foi padronizada em 30% em relação à massa total dos substratos. Testes preliminares indicaram aumento da conversão da reação em testes realizados com 10, 20 e 30% m/m de peneira molecular no meio, passando de 80,1 a 85,7% nas reações em sistema multicompetitivo de razão molar 1:2 e 1,5% m/m de biocatalisador Novozym 435 (dados não mostrados). Ainda que o aumento tenha sido discreto, preferiu-se adotar a maior carga para que a remoção da água formada não viesse a ser um fator limitante nas reações estudadas. Testes anteriores do nosso grupo de pesquisa (resultados não mostrados) indicaram que concentrações menores que 10% m/m não são eficazes na remoção da água formada em reações de esterificação conduzidas em frasco agitado. Esta diferença de desempenho tem relação também com a capacidade absorptiva da peneira molecular, estimada em cerca de 20% do seu peso (Lin e Ma, 2021). Considerando que reações típicas se baseiam em cerca de 0,01 mol de ácidos e cerca de 3 g de meio reacional, a quantidade máxima teórica de água formada seria de 0,01 mol (0,18 g de água) para cerca de 0,3 a 0,9 g de peneira molecular no meio (10 a 30%, respectivamente), observa-se que apenas a carga de 0,9 g seria capaz de absorver o máximo teórico de água formada.

Tabela 14: Atividade enzimática de esterificação para as lipases comerciais Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM medidas a partir de reação 1:1 entre ácido oleico e etanol à 40 °C. Os dados de atividade enzimática de esterificação foram obtidos a partir de experimentos em triplicata.

| Lipase imobilizada | Atividade enzimática de esterificação (U g ⁻¹) |
|--------------------|--|
| Novozym 435 | 2904 ± 242 |

| | |
|----------------|------------|
| Lipozyme RM IM | 2367 ± 125 |
| Lipozyme TL IM | 1128 ± 297 |

Tabela 15: Comparação das reações individuais dos ácidos acético, cáprico e oleico com os álcoois etanol e *n*-octanol e as reações em sistema multicompetitivo destes ácidos e álcoois reagindo simultaneamente, em condição equimolar e excesso estequiométrico do(s) álcool(is) com diferentes biocatalisadores em meios sem solvente. Os dados de conversão das reações foram obtidos a partir de experimentos em triplicata.

| Reação | Lipase imobilizada | Conversão após 4 h (%) | | | |
|-----------------------------------|--------------------|------------------------|------------|------------|------------|
| | | 1:1 sp | 1:1 cp | 1:2 sp | 1:2 cp |
| | Novozym 435 | 9,8 ± 2,1 | 17,7 ± 3,0 | 5,9 ± 1,8 | 7,5 ± 2,7 |
| Ácido Acético + Etanol | Lipozyme RM IM | - | - | - | - |
| | Lipozyme TL IM | - | - | - | - |
| | | | | | |
| | Novozym 435 | 45,7 ± 0,9 | 51,0 ± 2,4 | 80,4 ± 1,3 | 89,6 ± 1,4 |
| Ácido Acético + <i>n</i> -Octanol | Lipozyme RM IM | - | - | - | - |
| | Lipozyme TL IM | 24,9 ± 8,4 | 38,9 ± 3,3 | 36,6 ± 2,7 | 53,1 ± 2,0 |
| | | | | | |
| | Novozym 435 | 83,4 ± 2,7 | 86,6 ± 1,2 | 87,5 ± 1,3 | 93,1 ± 1,8 |
| Ácido Cáprico + Etanol | Lipozyme RM IM | 51,8 ± 3,2 | 59,9 ± 5,6 | 0,4 ± 0,1 | 1,7 ± 1,0 |
| | Lipozyme TL IM | 0,8 ± 0,7 | 58,4 ± 0,2 | 7,6 ± 1,2 | 29,1 ± 3,4 |
| | | | | | |
| | Novozym 435 | 86,5 ± 1,1 | 90,6 ± 1,4 | 92,6 ± 0,8 | 92,8 ± 1,1 |
| Ácido Cáprico + <i>n</i> -Octanol | Lipozyme RM IM | 85,3 ± 1,8 | 80,6 ± 2,0 | 89,7 ± 2,2 | 87,4 ± 3,1 |
| | Lipozyme TL IM | 69,9 ± 2,7 | 90,1 ± 1,1 | 86,1 ± 2,4 | 92,7 ± 1,2 |
| | | | | | |
| | Novozym 435 | 81,5 ± 2,8 | 78,5 ± 4,1 | 86,3 ± 1,3 | 77,4 ± 1,6 |
| Ácido Oleico + Etanol | Lipozyme RM IM | 49,9 ± 3,4 | 58,3 ± 1,4 | 55,6 ± 1,7 | 76,5 ± 2,0 |
| | Lipozyme TL IM | 33,3 ± 2,4 | 80,3 ± 4,4 | 24,6 ± 2,0 | 28,2 ± 3,3 |
| | | | | | |
| | Novozym 435 | 84,5 ± 1,2 | 87,3 ± 1,7 | 89,5 ± 2,0 | 87,3 ± 1,3 |
| Ácido Oleico + <i>n</i> -Octanol | Lipozyme RM IM | 89,4 ± 3,4 | 91,6 ± 4,0 | 90,5 ± 2,2 | 95,1 ± 2,4 |
| | Lipozyme TL IM | 83,1 ± 1,1 | 88,5 ± 2,3 | 87,8 ± 1,8 | 92,3 ± 0,7 |
| | | | | | |
| | Novozym 435 | 77,1 ± 2,0 | 88,0 ± 1,1 | 84,8 ± 1,4 | 89,1 ± 0,6 |
| Sistema multicompetitivo | Lipozyme RM IM | 15,7 ± 3,9 | 30,9 ± 2,5 | 50,4 ± 3,3 | 52,9 ± 1,2 |
| | Lipozyme TL IM | - | - | - | 53,7 ± 5,9 |
| | | | | | |

sp = sem peneira molecular ; cp = com peneira molecular (30% m/m total)

Ao analisar apenas os dados obtidos nas reações sem abordagens que possibilitem o deslocamento de equilíbrio (1:1 sp) mostrados na Tabela 15, é possível perceber que a posição de equilíbrio das reações individuais gradativamente aumenta (maiores conversões) à medida que o tamanho da cadeia dos ácidos e/ou dos álcoois envolvidos aumenta. Esta observação é indistinta em relação ao biocatalisador adotado nas sínteses, já que o biocatalisador não participa do equilíbrio químico, agindo apenas nas taxas (cinética) da reação. Apesar desta tendência ser observada nas reações catalisadas pelos três biocatalisadores estudados, há diferenças substanciais nas conversões dos ácidos nas reações catalisadas por estes em 4 h de reação, o que reflete as diferentes suscetibilidades dos biocatalisadores a efeitos inibitórios dos reagentes envolvidos. Flores e colaboradores (2000) (Flores *et al.*, 2000) discutem que ao longo das esterificações com ácidos e álcoois de cadeia longa, os ésteres formados – hidrofóbicos (apolares) – estão muito solvatados pelos reagentes não convertidos. Em decorrência da forte solvatação, os ésteres de cadeia longa tem baixa atividade termodinâmica, e assim, são muito pouco suscetíveis a sofrerem hidrólise. Os ésteres de cadeia curta são menos hidrofóbicos que os de cadeia longa, mas ainda sim são mais hidrofóbicos que seus respectivos ácidos e álcoois de origem, tendo atividades termodinâmicas mais altas (Flores *et al.*, 2000). Desta forma, a posição de equilíbrio químico da reação com reagentes de cadeia longa está mais no sentido da síntese do que da hidrólise apenas e tão somente pela natureza dos reagentes envolvidos. Os experimentos apresentados na primeira coluna da Tabela 15, conduzidos sem abordagens para o deslocamento do equilíbrio – 1:1 sem peneira molecular – corroboram essa tese. Esta tendência é melhor observada com a Novozym 435, biocatalisador mais estável e de melhor desempenho em presença de reagentes de cadeia curta (ácido acético e etanol) (Hernández-Martín e Otero, 2008; Martins *et al.*, 2014).

Nas reações do sistema multicompetitivo foram identificados, por detector de espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa, todos os ésteres preconizados teoricamente – acetato de etila, acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila. Picos e espectros adicionais observados no sistema multicompetitivo referem-se às impurezas dos reagentes de origem, cuja existência foi comprovada através de análises dos reagentes isoladamente ou em reações individuais.

As discussões específicas sobre as reações individuais e as reações em sistema multicompetitivo foram divididas em três partes: uma dedicada à síntese dos ésteres de cadeia

curta, outra dedicada à síntese dos ésteres de cadeia média-longa e outra às reações em sistema multicompetitivo, nos quais ésteres de cadeia curta, média e longa são sintetizados simultaneamente.

6.1.1 Ésteres/reagentes de cadeia curta - reações individuais

Os resultados mostrados na Tabela 15 demonstram que as reações com os reagentes de cadeia curta (ácido acético e etanol, C2) atingem as menores conversões dentre todos os testes realizados – inferiores a 20% em 4 h de reação. Estes resultados estão de acordo com Belafi-Bakó e colaboradores (2003), que afirmam que as conversões em síntese enzimáticas do acetato de etila estão entre as menores reportadas na literatura. Em um estudo comparativo dos três biocatalisadores aqui testados, Martins e colaboradores (2014) (Martins *et al.*, 2014) obtiveram conversões inferiores a 10% na síntese do acetato de etila catalisadas por Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM em presença de *n*-hexano como solvente (0,1 mol L⁻¹ de concentração de ácido acético e etanol), utilizando cargas de biocatalisador elevadas – 10% m/m e 30% m/m, respectivamente – em 2 h de reação. De forma similar, Baek e colaboradores (2020) (Baek *et al.*, 2020) obtiveram conversões inferiores a 10% na reação do ácido fórmico (C1) com *n*-octanol catalisadas por Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM em presença de *n*-hexano como solvente.

Esta observação sobre a síntese do acetato de etila é igualmente válida para os 3 biocatalisadores testados, que diferem consideravelmente em termos de estrutura proteica e suporte de imobilização, embora ocorra em diferentes graus de intensidade para cada um deles. Na estrutura proteica da lipase B de *Candida antarctica*, o sítio ativo tem a forma de canal e é rodeado por uma grande região hidrofóbica, com a presença de uma pequena “tampa” recobrimdo o sítio ativo, o que leva a sugerir que esta lipase realiza alterações conformacionais menos intensas que as demais lipases que possuem tampas grandes. Além disso, o suporte de imobilização (Lewatit VP 1600 OC) é moderadamente hidrofóbico (Martinelle e Hult, 1995; Ortiz *et al.*, 2019; Villalba *et al.*, 2016). A lipase de *Rhizomucor miehei* possui uma tampa em formato de hélice cobrindo o sítio ativo, sendo muito suscetível à variações no pH e na atividade termodinâmica da água; o suporte de imobilização da versão comercial Lipozyme RM IM é relativamente hidrofílico (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010). A lipase de *Thermomyces lanuginosus* também possui uma tampa cobrindo o sítio ativo, um ótimo de atividade em pH alcalino (9,0), e um resíduo de triptofano na tampa, que

auxilia a eficiência de sua atividade hidrolítica, tendo um suporte de imobilização hidrofílico – partículas de silicato (Fernandez-Lafuente, 2010). Em suma, mesmo lipases com características muito distintas entre si, elas apresentam tendências similares em relação ao desempenho frente a substratos de cadeia curta. Embora o sítio ativo das lipases estudadas – a tríade catalítica composta pelos aminoácidos serina, histidina e asparagina – seja relativamente polar, há pouca afinidade deste pelos substratos de menor tamanho de cadeia já que os sítios de ligação ao redor do sítio ativo das lipases são geralmente hidrofóbicos (Park e Park, 2022; Pleiss, Fischer e Schmid, 1998). Isto pode ser associado com o fato de que, dentre os substratos naturais das lipases, predominam compostos altamente hidrofóbicos de cadeia longa (Park e Park, 2022; Shin e Seo, 2023). O trabalho de Huang e colaboradores (1998) discute que o ácido acético pode reagir preferencialmente com os resíduos de serina do sítio ativo antes de sofrer o ataque nucleófilo pelo álcool na reação de esterificação (Huang, Chang e Goto, 1998). Esta observação também é mencionada por outros trabalhos reportadas na literatura (Hari Krishna *et al.*, 2001; López-Fernández *et al.*, 2022).

Não apenas a estrutura proteica próxima ao sítio ativo ajuda a explicar a dificuldade das lipases em converter tais substratos. Os reagentes de cadeia curta, sendo polares e capazes de realizar ligações de hidrogênio com grupos polares das lipases, tem considerável afinidade por água. Isso os leva a interagir fortemente com a camada de hidratação que circunda as proteínas (Banik *et al.*, 2016; Bezbradica *et al.*, 2007; Idris e Bukhari, 2012; Laane *et al.*, 1987; Marty, Dossat e Condoret, 1997). Tal camada é responsável por dar flexibilidade para que as lipases (bem como outras enzimas) realizem alterações conformacionais necessárias para a atividade catalítica (Banik *et al.*, 2017; Branco *et al.*, 2009; Klibanov, 2001; Malcata *et al.*, 1992). Em meios orgânicos isentos de água, esta flexibilidade é bastante limitada baseada no fato de que apenas a água de hidratação ao redor da enzima permanece, sem nenhuma outra água livre no meio (Klibanov, 2001). O trabalho de Laane e colaboradores (1987) (Laane *et al.*, 1987) sugeriu que substratos polares podem vir a se acumular na camada de hidratação das enzimas, chegando a um nível de concentração que pode levar à desnaturação das enzimas; o trabalho de Hari-Krishna e colaboradores (2001) atesta isso experimentalmente, observando que após a lavagem com água da lipase imobilizada Lipozyme IM-20, utilizada na síntese de acetato de isoamila, observa-se uma acidez residual na água de lavagem, com o biocatalisador sendo desativado após 72 h mesmo em presença de solvente (*n*-heptano) (Hari Krishna *et al.*, 2001). Neste sentido, a presença de reagentes que afetem a camada de hidratação tende a diminuir ainda mais a flexibilidade enzimática,

modificando a estrutura proteica (Branco *et al.*, 2009) e, portanto, reduzindo a atividade enzimática.

Esta redução de atividade, somada aos efeitos inibitórios próprios de cada reagente, leva a longos tempos de reação na síntese enzimática de ésteres de cadeia curta com diferentes biocatalisadores, como demonstrado na literatura nas sínteses sem solvente de acetato de butila (12 h) (Salah, Ben *et al.*, 2007), de acetato de isopentila (6 - 10 h) (Ghamgui *et al.*, 2006; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Lorenzo *et al.*, 2023; Narwal *et al.*, 2016), propionato de butila (10 - 24 h) (Dai *et al.*, 2014; Kuperkar *et al.*, 2014), butirato de butila (6 - 10 h) (Rahman *et al.*, 2017; Sharma *et al.*, 2024), valerato de etila (24 h) (Bayramoğlu *et al.*, 2011; Hussin *et al.*, 2021) e propionato de benzila (6 - 24 h) (Meneses, de *et al.*, 2019; Sá *et al.*, 2018). Uma exceção é a síntese do valerato de etila conduzida por Cébrian-Garcia e colaboradores (2018) (Cebrián-García, Balu e Luque, 2018), que resultou em 90% de conversão em sistema sem solvente em apenas 2 h de reação com a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em tetraetilortosilicato. Contudo, este resultado foi obtido utilizando-se elevada carga de biocatalisador no meio (12% m/v). Os efeitos de redução da atividade enzimática pela hidrofiliabilidade do meio foram, então, compensados neste estudo por uma alta carga de biocatalisador (da qual o tempo de reação depende diretamente). Esta estratégia, contudo, não é efetiva economicamente dado o custo alto dos biocatalisadores em comparação com o valor de venda do produto obtido. Com exceção dos estudos de Sá e co-autores (2018) (Sá *et al.*, 2018) e Meneses e co-autores (2019) (Meneses, de *et al.*, 2019), todos os estudos acima citados não adotaram estratégias de remoção da água formada para deslocamento do equilíbrio da reação de esterificação; ainda que não discutido explicitamente por estes estudos, a água formada na reação de esterificação pode auxiliar na reposição da camada de hidratação das lipases, ajudando a manter a atividade enzimática e permitindo que a reação atinja rendimentos razoáveis ao longo do tempo (Sousa *et al.*, 2021c). Outro fator importante a ser citado: todos estes estudos citados envolvem pelo menos 1 reagente com tamanho de cadeia superior a 3 carbonos, o que já torna a síntese menos desafiadora que o caso estudado nesta tese, seja pela menor polaridade/hidrofiliabilidade, seja pela menor força ácida (pKa) do ácido envolvido. No caso dos álcoois, Chen & Wu (2003) (Chen e Wu, 2003) reportam que *n*-propanol e *n*-butanol (3 e 4 carbonos) tem efeitos deletérios menos intensos do que metanol e etanol (1 e 2 carbonos) em reações de transesterificação catalisadas por Novozym 435 (Chen e Wu, 2003).

Ácido acético e etanol são amplamente descritos na literatura como reagentes com forte poder inibitório sobre as lipases (Aguieiras *et al.*, 2014; Chulalaksanakul *et al.*, 1990; Diaz *et al.*, 2010; Foresti e Ferreira, 2005; Gawas, Jadhav e Rathod, 2016; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Hernández-Martín e Otero, 2008; Lorenzo *et al.*, 2023; Mangiagalli *et al.*, 2022; Marín-Suárez *et al.*, 2019; Martins *et al.*, 2011; Oliveira *et al.*, 2001; Poppe *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2010; Salah, Ben *et al.*, 2007), atuando como inibidores competitivos (Claon e Akoh, 1993; Couto *et al.*, 2011; Gawas, Jadhav e Rathod, 2016; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Hari Krishna *et al.*, 2001; Ikeda e Kurokawa, 2001; Lotti *et al.*, 2015; Sandoval *et al.*, 2002). Nas sínteses de acetato de butila estudadas por Salah e co-autores (2007) (Salah, Ben *et al.*, 2007) e Martins e co-autores (2011) (Martins *et al.*, 2011) em *n*-hexano, as concentrações de ácido acético foram inferiores a 0,4 mol L⁻¹ (24 g L⁻¹). Nas sínteses de acetato de iso e *n*-pentila com Novozym 435 sem solventes, estudadas respectivamente Lorenzo e co-autores (2023) (Lorenzo *et al.*, 2023) e Güvenç e co-autores (2002) (Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002), as concentrações de ácido acético foram de 3,6 mol L⁻¹ (216 g L⁻¹), reforçando o argumento exposto acima em relação ao tamanho de cadeia do álcool envolvido na síntese. Os dados obtidos neste trabalho e mostrados na Tabela 15 também reforçam esta tendência – a síntese do acetato de octila catalisada por Novozym 435 atingiu conversões superiores a 80% em condição 1:2, com concentração de ácido acético igual a 2,7 mol L⁻¹ (162 g L⁻¹, respectivamente); esta mesma síntese catalisada por Lipozyme TL IM, na mesma condição 1:2, atingiu conversão de 36,6% após 4 h de reação. As concentrações de ácido acético estudadas, se avaliadas isoladamente, foram toleradas pela Novozym 435 e parcialmente pela Lipozyme TL IM (no caso da síntese do acetato do octila).

A literatura reporta as dificuldades com as sínteses enzimáticas de ésteres utilizando o ácido acético (Bélafi-Bakó *et al.*, 2003; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Hari Krishna *et al.*, 2001; Martinez-Garcia *et al.*, 2024), também devido à sua relativa força ácida (pK_a = 4,7), que reduz o pH dos arredores da enzima afastando-o da faixa ótima de atividade enzimática (Cambou e Klibanov, 1984; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Hari Krishna *et al.*, 2001; Ikeda e Kurokawa, 2001). Os efeitos deletérios da acidez elevada no meio reacional foram estudados experimentalmente por Hasegawa e co-autores (2008) (Hasegawa, Azuma e Takahashi, 2008) na esterificação do ácido láctico (pK_a = 3,8) com o etanol catalisada por diferentes lipases imobilizadas, atestando a necessidade do uso de solventes (polares, neste caso) para atenuar a acidez do meio reacional. O trabalho de Langrand e co-autores (1990) (Langrand *et al.*, 1990) ao estudar as sínteses de ésteres de cadeia curta

catalisadas por diferentes lipases em presença de solvente (*n*-heptano) observou que as sínteses dos acetatos apresentaram os menores rendimentos quando comparadas aos ésteres dos ácidos propiônico, butírico, valérico e capróico com álcoois de 1 a 10 carbonos (Langrand *et al.*, 1990). Observações similares também se encontram no trabalho de Claon e co-autores (1993) (Claon e Akoh, 1993), que avaliaram uma série de reações entre ácidos carboxílicos e álcoois terpênicos (geraniol e citronelol). Neste sentido, a utilização de razões molares ácido:álcoois elevadas ou a adoção de solventes são usuais nas sínteses de ésteres envolvendo o ácido acético (Bélafi-Bakó *et al.*, 2003; Couto *et al.*, 2011; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Ikeda e Kurokawa, 2001; Langrand *et al.*, 1990; Langrand, Triantaphylides e Baratti, 1988; Martins *et al.*, 2011, 2014; Mehta *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021).

A acidez do meio reacional causada pelo ácido acético também varia de acordo com o álcool presente no meio reacional. A determinação experimental da acidez de 0,00333 mol de ácido acético com 0,005 mol de etanol equivale a cerca de 1065 mg KOH g⁻¹ de amostra. Já a acidez dos mesmos 0,00333 mol de ácido acético com 0,005 mol de *n*-octanol equivale a cerca de 860 mg KOH g⁻¹ de amostra. Isso indica que o meio reacional da síntese do acetato de etila é mais ácido que o meio da síntese do acetato de octila, ainda que ambos tenham a mesma quantidade molar de ácido acético, trazendo um obstáculo adicional para os biocatalisadores atuarem nesta síntese. Esta diferença de acidez no meio pode ser explicada pelas diferenças de basicidade do etanol e do *n*-octanol, expressas pelo coeficiente β da equação de Kamlet-Taft ou ainda pela maior possibilidade de dissociação do etanol em íons H⁺ e H₃CCH₂O⁻ (íon alcóxido) em relação ao *n*-octanol (Kütt *et al.*, 2018; Sousa *et al.*, 2021b). A diferença de acidez do meio reacional ácido acético e etanol e o meio ácido acético e *n*-octanol contribui para justificar o fato de que duas sínteses com a mesma concentração de ácido acético atingem conversões tão díspares no mesmo intervalo de tempo, como o que ocorre com as sínteses do acetato de etila e do acetato de octila catalisadas por Lipozyme TL IM (0% e 38,9% na condição 1:1 sp).

Outra característica importante do meio reacional na síntese enzimática do acetato de etila é a capacidade deste de solubilizar água. Esta capacidade tem grande impacto na posição de equilíbrio da reação (Flores *et al.*, 2000; Goldberg, Thomas e Legoy, 1990; Halling, 1994; Kuo e Parkin, 1996; Svensson *et al.*, 1994; Valivety *et al.*, 1991). Tanto o ácido acético quanto o etanol possuem ampla afinidade por água e o acetato de etila pode dissolver até 3% em peso de água (PUBCHEM, 2004). Se considerarmos uma conversão de 20% de ácido acético em acetato de etila partindo de 0,01 mol de ácido acético e 0,02 mol de etanol,

teremos a formação de 0,002 mol de acetato de etila (0,1762 g) e 0,002 mol de água (0,03602); a quantia de água formada equivale a 20% em peso de acetato de etila e, ainda que esteja acima da capacidade de absorção deste, estará dissolvida no excedente de etanol e no ácido acético não reagido, constituindo uma única fase no meio reacional. Desta forma, a hidrólise tende a ser favorecida em detrimento da esterificação, justificando a dificuldade destas sínteses ocorrerem em meios sem solvente.

Para o etanol, a literatura reporta com frequência adições seriadas deste, visando manter o nível de concentração baixo para reduzir os efeitos inibitórios/desnaturantes (Aguieiras *et al.*, 2014; Aguiéiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Chen e Wu, 2003; Mangiagalli *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2010) (Hidayat *et al.*, 2014; Lotti *et al.*, 2014). O etanol liga-se aos domínios não catalíticos das lipases, modificando a estrutura proteica e reduzindo sua atividade e também pode ligar-se ao complexo acil-enzima formado durante a reação (Foresti *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2001). O estudo de José e co-autores (2011) com a Novozym 435 aponta que o etanol tem capacidade de afetar a estrutura secundária da lipase B de *Candida antarctica* (José *et al.*, 2011). No estudo conduzido por Gao e co-autores (2010) aponta que, quando comparado com álcoois de 3 e 4 carbonos, o etanol desfavorece a exposição dos resíduos hidrofóbicos ao redor do sítio ativo da CALB, afetando sua conformação tridimensional e reduzindo sua atividade enzimática de hidrólise do óleo de oliva (Gao *et al.*, 2010). O estudo de Mangiagalli e co-autores (2022) (Mangiagalli *et al.*, 2022) investigou os efeitos do etanol sob a Novozym 435, identificando dois principais mecanismos pelos quais o biocatalisador sofre efeitos deletérios causados pelos álcoois de cadeia curta em altas concentrações – i) mudanças conformacionais da enzima que levam a agregação proteica e inativação irreversível do biocatalisador; e ii) enfraquecimento das interações enzima-suporte que resulta na desorção da enzima meio reacional. Ressalta-se que este estudo foi conduzido após o biocatalisador ter passado por um processo de liofilização, para isolar os efeitos decorrentes da camada de hidratação da enzima e avaliar apenas as mudanças conformacionais e as relacionadas ao suporte de imobilização. Adicionalmente, frisa-se que estas observações foram feitas com o biocatalisador mais robusto e tolerante a reagentes de cadeia curta testado neste trabalho (Novozym 435), sugerindo que efeitos deletérios como estes possam ter ocorrido com os outros biocatalisadores (Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM). Outros trabalhos na literatura destacam a capacidade dos álcoois de cadeia curta de dissolver suporte de imobilização das lipases e a consequente desorção da enzima do suporte (Aguieiras *et al.*, 2016; José *et al.*, 2011; Mangiagalli *et al.*, 2022). O

trabalho de Aguiéiras e colaboradores (2016) mostra que a incubação dos biocatalisadores Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM em etanol por 2 h resultou em redução da atividade enzimática de esterificação/transesterificação; além disso, observaram dessorção das enzimas do suporte para os 3 casos e dissolução/alteração textural dos suportes de imobilização para Novozym 435 e Lipozyme TL IM na incubação com etanol (Aguiéiras, Erika C.G. *et al.*, 2016). Nas sínteses realizadas com ácido acético e etanol catalisadas tanto por Lipozyme RM IM quanto por Lipozyme TL IM, observou-se intenso turvamento do meio reacional ao término do período avaliado, sugerindo possível dissolução do suporte de imobilização dos biocatalisadores. A dissolução do suporte de imobilização, ainda que parcial, desestrutura o biocatalisador na reação e traz prejuízos para o processo – perda da estabilidade operacional (e potencialmente redução da capacidade de reuso) e contaminação do produto formado, levando a necessidade de etapas adicionais de purificação.

Por fim, vale a pena destacar a diferença entre atividade enzimática de esterificação e de hidrólise. Ainda que os três biocatalisadores apresentem atividades de esterificação entre 1000 e 4000 U g⁻¹, as atividades hidrolíticas destes são muito diferentes, conforme reportado nos trabalhos de Hernández-Martín & Otero (2008) e Martins e co-autores (2014) (Hernández-Martín e Otero, 2008; Martins *et al.*, 2014). A atividade enzimática de hidrólise da tributirina (triglicerídeo com cadeia graxa curta) é de 3000 U g⁻¹ para a Novozym 435, 40 U g⁻¹ para a Lipozyme RM IM e 20000 U g⁻¹ para a Lipozyme TL IM (Hernández-Martín e Otero, 2008). Quando considerada as atividades hidrolíticas baseadas na hidrólise do óleo de soja, tem-se para 3,6 U g⁻¹ para Novozym 435, 13,6 U g⁻¹ para Lipozyme RM IM e 16,6 U g⁻¹ para Lipozyme TL IM, indicando que a Lipozyme TL IM tem atividade hidrolítica 4,6 vezes maior que a Novozym 435 nas condições avaliadas (Martins *et al.*, 2014). Quando consideradas as atividades hidrolíticas baseadas na hidrólise do óleo de oliva, tem-se 37,2 U g⁻¹ para Novozym 435, 67,4 U g⁻¹ para Lipozyme RM IM e 1290 U g⁻¹ para Lipozyme TL IM, indicando que a Lipozyme TL IM tem atividade hidrolítica 34,9 vezes maior que a Novozym 435 nas condições testadas (Freitas *et al.*, 2007; Soares *et al.*, 1999). Esses dados demonstram dois aspectos importantes: a baixa afinidade da Lipozyme RM IM por substratos de cadeia curta e a alta atividade hidrolítica da Lipozyme TL IM. No caso das sínteses de ésteres de cadeia curta, além de todas as questões já discutidas sobre as dificuldades das lipases atuarem nesses meios, a Lipozyme TL IM possui maior atividade de hidrólise dos ésteres do que atividade de síntese. Isto não significa, todavia, que a Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM sejam biocatalisadores inapropriados para a síntese de ésteres, como pode ser verificado por

vários exemplos de suas aplicações com este fim (Anschau *et al.*, 2021; Hari Krishna *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2013a; Paludo *et al.*, 2014; Richetti *et al.*, 2010; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2020) além dos dados da Tabela 15 para ésteres de cadeia longa. Todavia, a conjunção de fatores intrínsecos (baixa afinidade enzimática pelos substratos de cadeia, alta atividade hidrolítica) e extrínsecos (reagentes hidrofílicos capazes de solubilizar a água na fase orgânica) levam a um resultado insatisfatório para o processo biocatalítico aqui estudado.

Considerando todos os efeitos deletérios dos reagentes de cadeia curta sobre as lipases, é desejável que as concentrações destes sejam relativamente baixas. Contudo, para evitar o uso de solventes e todas as implicações negativas destes para o processo, as reações em sistema multicompetitivo se mostram como alternativa promissora, já que é possível sintetizar os ésteres de cadeia curta de forma conjugada a outros ésteres de interesse, contanto que as concentrações dos reagentes de cadeia curta sejam toleradas pelo biocatalisador selecionado. As esterificações dos ácidos estudados com o etanol (C2) atingem menores conversão do que as com o *n*-octanol (C8), o que pode ser exemplificado pela grande diferença das conversões atingidas nas sínteses do oleato de etila (49,9%) e do oleato de octila (89,4%) catalisadas por Lipozyme RM IM em condição equimolar. De forma similar, as esterificações do ácido acético (C2) também apresentam menores conversões do que as esterificações dos ácido cáprico (C10) e oleico (C18), de acordo com os dados mostrados na Tabela 15.

6.1.2 Ésteres/reagentes de cadeia média e longa – reações individuais

Para as reações individuais com os reagentes de cadeia média e longa (ácido cáprico, ácido oleico, *n*-octanol), observaram-se conversões superiores a 50% em 4 h de reação, em concordância com o que se observa na literatura de modo geral (Aguieiras *et al.*, 2019; Jaiswal e Rathod, 2019; Kuo *et al.*, 2012; Madras, Kumar e Modak, 2004; Pereira *et al.*, 2018; Rocha, Gil e Garcia, 1999; Serrano-Arnaldos *et al.*, 2019; Sose, Bansode e Rathod, 2017; Sousa *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2021a). À medida que a hidrofobicidade inicial do meio reacional aumenta devido à presença de reagentes de cadeia média ou longa, as conversões aumentam, mesmo quando avaliadas as reações sem deslocamento do equilíbrio químico (equimolar, sem peneira molecular). Em outras palavras, a posição de equilíbrio dessas reações situa-se mais na direção da esterificação do que na direção da hidrólise, conforme indica o já mencionado estudo de Flores e co-autores (2000) (Flores *et al.*, 2000). Efeitos

mais intensos de solvatação dos ésteres de cadeia longa (hidrofóbicos) são esperados em meios cujo ácido e/ou álcool de origem também são hidrofóbicos, o que não ocorre tão intensamente com ésteres de cadeia curta (relativamente hidrofóbicos, pouco hidrofílicos) com ácidos e álcoois de cadeia curta (mais hidrofílicos). Esta intensificação da solvatação diminui a atividade termodinâmica dos ésteres e, somada a um particionamento natural da água formada em sistemas livre de solventes, leva o processo a ser menos suscetível à hidrólise, o que significa estar mais deslocado em direção à síntese (Flores *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2002; Sousa *et al.*, 2021b).

Para evidenciar o efeito da presença de reagentes de cadeia média e longa, pode-se avaliar o caso das sínteses com ácido acético e *n*-octanol (C8), que em condição de excesso estequiométrico (1:2) superaram 80% de conversão em 4 h de reação, chegando a um máximo de cerca de 89,0% na presença de peneira molecular com Novozym 435. A mesma condição reacional (1:2 cp) na síntese com ácido acético e etanol (C2) catalisada por Novozym 435 atingiu apenas 7,5% de conversão. Comparação equivalente pode ser feita com a Lipozyme TL IM, que na condição 1:2 cp na síntese do acetato de octila atingiu 53,1% de conversão e não apresentou nenhuma conversão após 4 h de reação na síntese do acetato de etila sob a mesma condição reacional. Observações similares a esta foram obtidas no trabalho de Markus e colaboradores (2017) comparando a síntese dos acetatos de etila, propila, *n*-butila, *n*-pentila, *n*-hexila, *n*-heptila e *n*-octila, com conversões crescentes à medida que o tamanho de cadeia do álcool aumenta (de 31,4% a 76,4% de conversão, respectivamente, usando *n*-hexano como solvente) (Markus *et al.*, 2017). O excesso estequiométrico do *n*-octanol contribuiu para o deslocamento do equilíbrio no sentido da síntese, ao passo que o mesmo excesso estequiométrico de etanol não ocasionou este efeito, considerando que em ambos os casos tem-se uma menor concentração de ácido acético comparada à condição equimolar. O excesso de *n*-octanol provoca um aumento da hidrofobicidade do meio, favorecendo o particionamento da água formada, reduzindo a probabilidade de hidrólise e levando à maiores conversões do que observado em condição equimolar. Neste caso, os efeitos deletérios do ácido acético (cadeia curta) foram atenuados pelo *n*-octanol (cadeia média).

Raciocínio similar – atenuação dos efeitos deletérios dos reagentes de cadeia curta – aplica-se em algumas das sínteses envolvendo o etanol, como visto nas reações com o ácido cáprico (cadeia média) e o ácido oleico (cadeia longa), que atingiram conversões superiores a 80% em condição equimolar e ausência de peneira molecular (sem deslocamento do equilíbrio) nas sínteses catalisadas por Novozym 435 (Tabela 15). Já com a Lipozyme RM

IM, a mesma concentração de etanol nas reações com ácido cáprico e ácido oleico resultou, na maioria dos casos, em conversões inferiores a 60% no intervalo avaliado (4 h de reação), como no caso das sínteses do caprato de etila e oleato de etila em condição 1:1, e com a Lipozyme TL IM, conversões inferiores a 40%. Estas observações sugerem que a Lipozyme TL IM é mais suscetível aos efeitos danosos do etanol sob sua atividade enzimática do que pelos efeitos do ácido acético. Já a Lipozyme RM IM foi mais suscetível aos efeitos danosos do ácido acético do que do etanol nas condições estudadas.

As observações a respeito do comportamento da Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM podem estar associadas a dois fatores principais: i) hidrofobicidade do suporte de imobilização, que pode levar à dissolução/dessorção pelo etanol, ou pode restringir a transferência de massa com o acúmulo de água adsorvida no suporte (Lipozyme TL IM > Lipozyme RM IM > Novozym 435) e ii) tolerância ao etanol (Novozym 435 > Lipozyme RM IM > Lipozyme TL IM). A literatura confirma essas tendências, como afirmado nos trabalhos de Hernández-Martín & Otero (2008) e de Aguiéiras e co-autores (2016) (Aguiéiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Hernández-Martín e Otero, 2008). Neste sentido, ainda que reações multicompetitivas possam contornar os gargalos da síntese de ésteres de cadeia curta requer-se, para o bom desempenho do processo, biocatalisadores suportados em materiais relativamente hidrofóbicos e tolerantes a altas concentrações de álcoois e ácidos de cadeia curta. Para biocatalisadores com suportes hidrofílicos e menos tolerantes, faz-se necessário reduzir as concentrações dos reagentes de cadeia curta ou adotar batelada alimentada destes, ou ainda aumentar sobremaneira o tempo de reação para atingimento de conversões altas.

Já nas reações individuais dos ácidos cáprico e oleico com o *n*-octanol observa-se pelos dados da Tabela 15 uma menor dependência de estratégias de deslocamento do equilíbrio para atingimento de altas conversões (acima de 80%), com exceção da síntese do caprato de *n*-octila catalisada por Lipozyme TL IM em condição equimolar sem remoção da água formada (1:1 sp), que atingiu 69,9% de conversão. Esses resultados podem ser atribuídos tanto à maior hidrofobicidade dos meios reacionais iniciais quanto à tiposeletividade dos biocatalisadores estudados. A literatura reporta a preferência da lipase de *Rhizomucor miehei* por substratos de cadeia longa, como atestado no estudo Selmi e co-autores (1998) (Selmi *et al.*, 1998) e de Arsan & Parkin (2000) (Arsan e Parkin, 2000a), e revisado no artigo de Rodrigues & Fernandez-Lafuente (2010) (Rodrigues e Fernandez-Lafuente, 2010), destacando particularmente as sínteses com o ácido oleico; já a lipase de *Thermomyces lanuginosus* é amplamente estudada em processos de alcoólise de triglicerídeos

de cadeia longa (Choong *et al.*, 2018; Fernandez-Lafuente, 2010; Khor *et al.*, 2010; Noro *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2010; Rodrigues e Ayub, 2011).

6.1.3 Ésteres de cadeia curta, média e longa – sistema multicompetitivo

As reações em sistema multicompetitivo atingiram conversões similares às observadas nas sínteses dos ésteres de cadeia média e longa para as reações catalisadas por Novozym 435. As reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Lipozyme RM IM atingiram conversões similares às observadas em algumas condições reacionais nas sínteses dos ésteres etílicos (caprato e oleato de etila). Contudo, os resultados de conversão nas reações individuais dos ésteres octílicos (caprato e oleato de octila) foram superiores aos observados em sistema multicompetitivo, indicando que as concentrações de ácido acético e etanol foram prejudiciais para o desempenho da Lipozyme RM IM nas condições testadas. De forma ainda mais intensa, as concentrações dos reagentes de cadeia curta foram prejudiciais para as reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Lipozyme TL IM. As reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Lipozyme TL IM tiveram desempenho similar ao observado nas reações individuais com os reagentes de cadeia curta – inferiores a 10% no tempo de reação estudado (4 h), com exceção da condição 1:2 cp, que concilia as duas estratégias de deslocamento do equilíbrio da reação – excesso estequiométrico e remoção de um dos produtos. Neste sentido, é possível sugerir que, nas reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Lipozyme RM IM ou Lipozyme TL IM, os fatores intrínsecos – baixa afinidade destas lipases pelos substratos de cadeia curta, alta atividade hidrolítica destas lipases e baixa tolerância à altas concentrações de ácido acético e etanol – foram mais preponderantes para estes biocatalisadores do que para a Novozym 435. Por sua vez, os fatores extrínsecos supostamente mais favoráveis para o bom desempenho das lipases – aumento da hidrofobicidade do meio e redução da concentração dos reagentes de maior potencial inibidor/desativador – tiveram menor influência para o resultado geral com Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. Desta forma, os sistemas multicompetitivos apresentam como limitação a necessidade do biocatalisador tolerar concentrações relativamente altas (ainda que menores do que em reações individuais sem solvente) dos reagentes de cadeia curta envolvidos (neste caso específico, ácido acético e etanol).

As reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Novozym 435 sofreram maior impacto da retirada da água formada do que do excesso estequiométrico, como pode ser visto

na Tabela 15 ao comparar a conversão obtida nas condições 1:1 sp (77,1%) e 1:1 cp (88,0%). A comparação entre as condições 1:1 sp e 1:2 sp também ocasionou ganho de conversão (de 77,1% para 84,8%), mas inferior ao observado entre 1:1 sp e 1:1 cp. Já a comparação entre a condição 1:1 cp e 1:2 cp revela resultados similares de conversão (88,0% e 89,3%), reforçando que o sistema foi mais sensível à remoção da água no deslocamento do equilíbrio do que ao excesso estequiométrico. Análises das concentrações de água por Karl Fisher revelaram maiores concentrações de água na condição 1:2 do que na condição 1:1, sugerindo que o meio reacional 1:2 tem maior capacidade de solubilizar a água formada no meio orgânico do que o meio reacional 1:1, conforme mostrado na Figura 13 (b). Esta capacidade pode estar associada ao excedente de etanol presente na condição 1:2.

Pela análise da Figura 13 (a), é possível observar que a condição 1:1 cp é que atinge a maior conversão em 1 h de reação. As condições com excesso estequiométrico (1:2 sp e 1:2 cp) possuem maior concentração de etanol no meio reacional e, sendo este um inibidor da atuação da lipase imobilizada estudada, tende a reduzir os valores de conversão. A presença de maior concentração de água no meio reacional nas condições sem peneira molecular (1:1 sp e 1:2 sp) são as que apresentam as menores conversões, o que pode estar associado com a maior dissociação do ácido acético presente (redução do pH do microambiente enzimático), reduzindo a disponibilidade da forma não-ionizada deste ácido que participa da reação de esterificação.

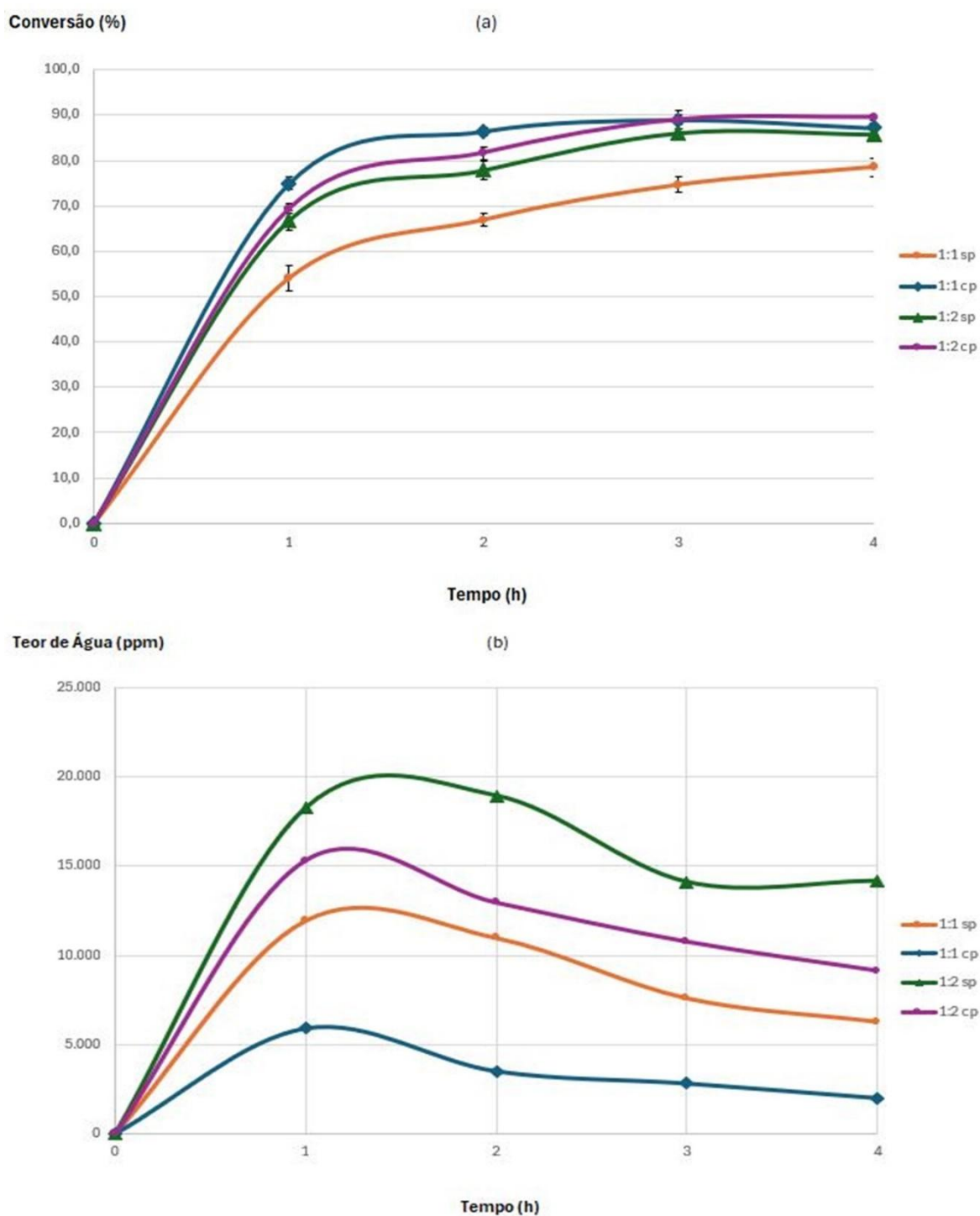


Figura 13: (a) Evolução da conversão (%) dos ácidos à ésteres e (b) concentração de água no meio orgânico ao longo do tempo nas reações em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oléico com etanol e *n*-octanol catalisadas por Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm), 50 °C, 100 U de carga de biocatalisador, em 4 diferentes condições reacionais – 1:1 e 1:2 sem peneira molecular (sp) e com peneira molecular (cp).

A menor concentração de água apresentada pela condição 1:1 cp (Figura 13 (b)) coincide com as maiores taxas reacionais apresentadas por esta condição (Figura 13 (a)) em

comparação com as demais condições testadas, reforçando que a remoção da água neste caso tem efeitos positivos tanto no aspecto termodinâmico (deslocamento do equilíbrio pela remoção da água formada na reação) quanto no aspecto cinético (maior atividade catalítica da Novozym 435). A literatura descreve que a lipase B de *Candida antarctica* (Novozym 435, mantém seu desempenho catalítico mesmo em meios com baixa atividade termodinâmica da água, o que já não ocorre com as lipases que formam os demais biocatalisadores – lipase de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM IM) e a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Lipozyme TL IM), com ótimos de atividade de água em 0,55 e 0,77, respectivamente (Adlercreutz, 2013; Valivety *et al.*, 1992). O impacto da retirada da água do meio reacional também fica bastante evidente ao comparar a condição 1:2 sp e 1:2 cp nas reações catalisadas por Lipozyme TL IM, conforme dados da Tabela 15. Neste caso, soma-se a essa discussão os efeitos das concentrações dos reagentes de cadeia curta no meio – em 1:2, temos menores concentrações de ácido acético (efeito cinético positivo), maiores concentrações de etanol (efeito cinético negativo, efeito termodinâmico positivo) e maior teor de água (efeito cinético positivo, efeito termodinâmico negativo), sendo o resultado obtido (53,7% de conversão após 4 h de reação) uma provável resultante destes fatores.

Tendo em vista que as reações em sistema multicompetitivo com Novozym 435 mostraram conversões similares ou superiores às obtidas nas reações individuais (particularmente as que envolvem reagentes de cadeia curta), três possibilidades foram levantadas para discussão mais ampla: i) a hidrofobicidade inicial do meio; ii) a concentração dos reagentes com potencial inibidor/desativador no meio; e iii) combinações destas. Para auxiliar a investigação destas hipóteses, a Tabela 16 compila os dados relacionados ao logP (medida da hidrofobicidade) dos meios reacionais e concentração dos reagentes de cadeia curta nas diferentes reações individuais e em sistema multicompetitivo.

Tabela 16: Características dos meios reacionais nas esterificações individuais entre ácidos e álcoois e na esterificação em sistema multicompetitivo

| Reação | Razão molar | logP | Índice de acidez médio (mg KOH g ⁻¹) | Concentração de ácido acético (g L ⁻¹) | Concentração de etanol (g L ⁻¹) |
|-----------------------------------|-------------|-------|--|--|---|
| Ácido Acético + Etanol | 1:1 | - 0,2 | 595 | 520 | 399 |
| | 1:2 | - 0,3 | 360 | 346 | 530 |
| Ácido Acético + <i>n</i> -Octanol | 1:1 | 1,4 | 284 | 280 | - |
| | 1:2 | 1,9 | 167 | 162 | - |
| Ácido Cáprico + | 1:1 | 1,9 | 347 | - | 183 |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----|-----|-----|----|-----|
| Etanol | 1:2 | 1,2 | 266 | - | 297 |
| Ácido Cáprico + <i>n</i> -Octanol | 1:1 | 3,5 | 233 | - | - |
| | 1:2 | 3,4 | 132 | - | - |
| Ácido Oleico + Etanol | 1:1 | 3,7 | 180 | - | 123 |
| | 1:2 | 2,3 | 156 | - | 212 |
| Ácido Oleico + <i>n</i> -Octanol | 1:1 | 5,3 | 133 | - | - |
| | 1:2 | 4,5 | 102 | - | - |
| Sistema Multicompetitivo | 1:1 | 2,6 | 205 | 67 | 78 |
| | 1:2 | 3,0 | 176 | 50 | 114 |

A questão da hidrofobicidade do meio reacional pode ser estudada tanto sob o aspecto termodinâmico – o equilíbrio químico da reação de esterificação – quanto pelo aspecto cinético – o desempenho dos biocatalisadores no meio. Como o meio reacional inicial em sistema multicompetitivo já é hidrofóbico ($\log P > 2,0$), a água formada no início da reação tem baixa solubilidade neste e essa solubilidade tende a se reduzir ainda mais à medida que os produtos, mais hidrofóbicos que os reagentes, vão se formando. Assim, ainda que a água possa estar pouco solvatada no meio reacional e com alta atividade termodinâmica (Flores *et al.*, 2000), tal hidrofobicidade do meio tende a formar uma segunda fase (distinta da fase orgânica) aquosa microscópica no meio, reduzindo a probabilidade de hidrólise, levando à altas conversões dos ácidos e álcoois aos respectivos ésteres. Ao estudar a síntese de oleato de etila em SFS, Foresti e colaboradores (2007) observaram, por meio de modelagem termodinâmica, a formação de uma segunda fase (aquosa) no meio quando a reação atingiu 15% de conversão de ácido oleico (Foresti *et al.*, 2007); devido à alta hidrofobicidade da fase orgânica, apenas uma fração muito pequena de água é capaz de ser solubilizada nesta, insuficiente para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da hidrólise. Desta forma, pode-se sugerir que um meio reacional hidrofóbico, tal como a reação em sistema multicompetitivo, se comporte de maneira similar, particionando a água formada em uma fase microscópica distinta, reduzindo a probabilidade de hidrólise e favorecendo a reação no sentido da síntese. Esta suposição se adequa bem aos dados obtidos nas reações individuais com o par mais hidrofóbico estudado (ácido oleico e *n*-octanol), que atingem altas conversões em éster mesmo em condição equimolar sem remoção da água formada, independente do biocatalisador estudado – 84,5% com Novozym 435, 89,4% com Lipozyme RM IM e 83,1% com Lipozyme TL IM (Tabela 15).

Sob a perspectiva cinética, a hidrofobicidade inicial do meio tende a contribuir com a preservação da camada de hidratação das lipases, que lhes permite a flexibilidade necessária

para a atividade catalítica (Adlercreutz, 2013; Klibanov, 2001). Por outro lado, a presença de reagentes hidrofílicos no meio, como o ácido acético e o etanol, pode levar a distorções nesta camada, prejudicando a atividade enzimática (Banik *et al.*, 2017; Bezbradica *et al.*, 2007; Branco *et al.*, 2009; Idris e Bukhari, 2012; Laane *et al.*, 1987; Marty, Dossat e Condoret, 1997). Com a redução da atividade enzimática a cinética reacional fica prejudicada, pois a lipase terá uma menor capacidade de converter os substratos em ésteres em um dado intervalo de tempo. No estudo de esterificações com diferentes ácidos e álcoois, vários autores demonstram a relação entre o aumento do tamanho de cadeia de um dos reagentes (ou hidrofobicidade do meio) e o aumento das conversões ao longo do tempo (Chen *et al.*, 2023; Diaz *et al.*, 2010; Flores *et al.*, 2000; Markus *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2014; Rosset *et al.*, 2013; Varma e Madras, 2010; Vaysse *et al.*, 2002; Woodcock *et al.*, 2008). A mistura dos reagentes de cadeia curta, média e longa resulta em um meio reacional inicial hidrofóbico (logP 2,6 na condição equimolar), ao passo que as reações individuais do ácido acético e etanol, ácido acético e *n*-octanol e ácido cáprico e etanol são consideradas hidrofílicas (logP < 2,0) tanto na condição equimolar quanto em excesso dos álcoois, variando de -0,2 a 1,9 (Tabela 16). A reação individual do ácido acético com o *n*-octanol catalisada por Novozym 435 na condição 1:2 (logP 1,9) atingiu conversão próxima de 90% em 4 horas de reação; as reações do ácido cáprico com o etanol também alcançou similar conversão, com especial destaque para a condição 1:2, de logP 1,2, que atingiu 93,1%. Por outro lado, reações com logP hidrofóbico, como as reações individuais do ácido oleico com o etanol catalisadas por Novozym 435 atingiram conversões inferiores a 80%, conforme mostrado na Tabela 15. Ainda que os dados da Tabela 15 mostrem uma tendência de aumento das conversões das reações individuais à medida que aumenta o tamanho de cadeia dos reagentes, independentemente do biocatalisador utilizado, o logP isoladamente não parece ser um parâmetro adequado para mensurar esta tendência, hipótese apontada por Halling (1990; 1994; 2004) que sugere que outras propriedades do solvente (ou, de forma extrapolada, do meio reacional) possam se correlacionar mais efetivamente com os efeitos observados nas enzimas em reações em equilíbrio (Halling, 1990, 1994; Halling *et al.*, 2004).

A influência da hidrofobicidade inicial do meio reacional nos sistemas multicompetitivos, independentemente dos componentes do meio, foi avaliada pela comparação com uma reação individual de mesmo logP que a reação em sistema multicompetitivo. Para tal, utilizou-se ácido nonanóico (C9) e *n*-pentanol (C5), cuja mistura em razão molar 1:1 resulta no logP 2,6 para compará-la com a reação em sistema

multicompetitivo 1:1. Utilizando-se a mesma carga dos biocatalisadores Novozym 435, Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM (100 U), mesmo volume reacional, agitação e temperatura que as reações em sistema multicompetitivo atingiram-se conversões de 86,2%, 81,8% e 82,2%, respectivamente, após 4 h de reação. Tanto o ácido nonanóico quanto o *n*-pentanol não são descritos na literatura como reagentes de efeito inibitório pronunciado, já que sínteses em meios sem solvente envolvendo estes reagentes atingem altos rendimentos em tempo curto de reação (Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; López-Fernández *et al.*, 2022; Narwal *et al.*, 2016). Isto evidencia mais intensamente os efeitos da hidrofobicidade inicial do meio sobre o desempenho das lipases. Sem considerar os efeitos deletérios causados pelos reagentes de cadeia curta, um meio reacional tão hidrofóbico quanto a reação em sistema multicompetitivo aqui estudada, levaria a reação a atingir níveis de conversão similares com os três biocatalisadores testados. A abordagem de considerar uma mistura de ácidos como um único ácido, assim como uma mistura de álcoois como um único álcool para fins de simplificação, não é inédita na literatura (Flores *et al.*, 2000; Serrano-arnaldos *et al.*, 2021). Sendo o logP um parâmetro limitado para a comparar a reação em sistema multicompetitivo com uma suposta “reação modelo”, a utilização de tal reação para simplificar o estudo de aspectos termodinâmicos e cinéticos relevantes (como atividade termodinâmica dos produtos ou parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten) fica inviabilizada. Estes resultados apenas reforçam a hipótese sugerida anteriormente – ainda que a hidrofobicidade geral do meio reacional favoreça a atividade enzimática de esterificação dos biocatalisadores, a presença de reagentes com possíveis efeitos deletérios e os efeitos particulares destes sobre cada biocatalisador continua sendo muito relevante para o caso.

A concentração dos reagentes de maior potencial inibitório sobre as lipases imobilizadas diz respeito à cinética reacional, mas também diz respeito à própria viabilidade técnica da síntese, devido à possível inativação do biocatalisador na presença destes. Dentre todos os meios reacionais avaliados, conforme dados da Tabela 16, as concentrações de ácido acético variaram de 50 a 520 g L⁻¹ e as de etanol variaram de 78 a 530 g L⁻¹. Para a Novozym 435, os impactos mais relevantes na conversão após 4 h se deram nas reações com concentrações superiores a 280 g L⁻¹ de ácido acético e concentrações superiores a 399 g L⁻¹ de etanol. Já para a Lipozyme RM IM, concentrações mais baixas destes dois reagentes – 162 g L⁻¹ de ácido acético e 123 g L⁻¹ de etanol – já tiveram impacto drástico na conversão após 4 h de reação. Para a Lipozyme TL IM, ainda que as concentrações de ácido acético na síntese do acetato de *n*-octila tenham sido maiores que as do sistema multicompetitivo e ainda que as

concentrações de etanol na síntese do oleato de etila também tenham sido maiores que as do sistema multicompetitivo, a presença conjunta destes dois reagentes pode ter contribuído para as conversões próximas ou iguais a zero observadas com este biocatalisador nas reações do sistema multicompetitivo no intervalo estudado (Tabela 15). Alguns poucos trabalhos da literatura envolvendo esterificações com o ácido acético são conduzidos em sistemas livres de solvente (Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Lorenzo *et al.*, 2023; Nyari *et al.*, 2018), obtendo altos rendimentos em reações catalisadas por Novozym 435 com concentrações de até 216 g L⁻¹ de ácido acético. Os tempos de reação nestes trabalhos foram de 6 até 8 h de reação. Em outros trabalhos consultados, as concentrações de ácido acético foram menores que 30 g L⁻¹ (Alves *et al.*, 2014; Diaz *et al.*, 2010; Graebin *et al.*, 2012; Markus *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2014; Salah, Ben *et al.*, 2007), inferiores ao estudado aqui, particularmente o sistema multicompetitivo. Dentre estes trabalhos citados, apenas o trabalho de Salah e co-autores (2007) utiliza um biocatalisador distinto (lipase imobilizada de *Rhizopus oryzae*) dos estudados neste trabalho (Salah, Ben *et al.*, 2007). Na condição 1:1, o meio reacional para síntese individual do acetato de etila possui concentração de ácido acético de 520 g L⁻¹ e índice de acidez inicial 595 mg KOH g⁻¹; na condição 1:2, este meio reacional apresenta 346 g L⁻¹ e índice de acidez inicial 360 mg KOH g⁻¹. Quanto mais elevada a concentração de ácido acético e/ou etanol, maior a probabilidade de inibição enzimática das lipases. A reação entre ácido acético e *n*-octanol em condição equimolar com Novozym 435 atinge apenas 22,0% de conversão em 1 h, ao passo que as demais reações individuais com ácido cáprico e ácido oleico estudadas superaram a marca de 50% de conversão no mesmo tempo com a mesma carga de biocatalisador Novozym 435 (100 U), conforme pode ser visto na Figura 11. Isto indica o efeito inibitório do ácido acético sob a Novozym 435 nesta concentração (162 g L⁻¹); a mesma concentração, por outro lado, inativou a Lipozyme RM IM e permitiu alcançar conversão similar (24,9%) apenas após 4 h de reação para a reação catalisada por Lipozyme TL IM.

A natureza específica de cada meio reacional – ou mais especificamente, as concentrações de ácido acético e etanol – parece ter maior impacto para o desempenho da Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM do que a hidrofobicidade resultante do meio. Para sustentar tal afirmação, estudaram-se sistemas multicompetitivos com concentrações inferiores a 50 g L⁻¹ de ácido acético e 114 g L⁻¹ de etanol, utilizando 100 U de carga de biocatalisador a 50 °C, em presença de peneira molecular 3Å. Adotaram-se as concentrações de 25 g L⁻¹ de ácido acético e 57 g L⁻¹ de etanol para os testes, compensando o sistema com

quantidades adicionais dos outros ácidos e do *n*-octanol para manter a mesma razão molar ácidos:álcoois (1:1). O logP calculado deste meio reacional é de 3,3 (hidrofóbico), superior aos das condições 1:1 e 1:2 nas reações em sistema multicompetitivo (2,6 e 3,0, respectivamente). As conversões foram avaliadas em 4 h e 24 h de reação. A reação do sistema multicompetitivo catalisada por Lipozyme RM IM nesta condição resultou em conversão de 49,4% após 4 h e 64,0% após 24 h de reação; já a reação em sistema multicompetitivo catalisada por Lipozyme TL IM resultou em conversão de 47,1% após 4 h e 69,4% após 24 h de reação. As diferenças de conversão observadas entre 4 e 24 h (14 e 22% de aumento) com os dois biocatalisadores testados atestam os efeitos inibitórios do ácido acético e do etanol, que neste caso, estão em um nível de concentração tolerável por estes biocatalisadores. O maior ganho de conversão nesta avaliação foi para a reação catalisada por Lipozyme TL IM que, na condição 1:1 do sistema multicompetitivo (concentração de 50 g L⁻¹ de ácido acético e 114 g L⁻¹ de etanol), não tinha apresentado nenhuma conversão observável após 4 h de reação. Para a Lipozyme RM IM, contudo, uma diferença bem menos pronunciada foi observada – em concentrações maiores de ácido acético e etanol, a conversão após 4 h de reação havia sido de 40,0%. Os resultados confirmam o descrito na literatura sobre a menor tolerância destes biocatalisadores ao ácido acético e ao etanol em relação a Novozym 435 (Aguieiras, Erika C.G. *et al.*, 2016; Aljawish *et al.*, 2019; Hernández-Martín e Otero, 2008; Martins *et al.*, 2014). Contudo, nestes casos nem a redução da concentração do ácido acético e do etanol e nem o consequente aumento da hidrofobicidade inicial do meio foram suficientes para obter conversões acima de 80% no intervalo estudado. Para aplicar estes biocatalisadores no sistema multicompetitivo aqui estudado, seria necessário reduzir ainda mais as concentrações destes reagentes, obtendo concentrações muito reduzidas dos respectivos ésteres, ou adotar sistemas de bateladas alimentadas. Outras possibilidades seriam aumentar o tempo de reação ou aumentar o excesso estequiométrico dos álcoois. Estas estratégias, contudo, não foram consideradas por prejudicar as métricas de processo em busca de uma potencial viabilidade técnico-econômica.

Estes resultados indicam que, ainda que a reação em sistema multicompetitivo no geral seja favorável à atividade do biocatalisador e ao atingimento de altas conversões em ésteres, a natureza específica de cada componente das misturas ácida e alcoólica tem grande impacto no desempenho dos biocatalisadores e no processo como um todo. Ainda neste sentido, realizaram-se experimentos customizando o sistema multicompetitivo para investigar mais os efeitos do ácido acético e do etanol nas sínteses. Como as reações catalisadas por

Lipozyme RM IM pareceram muito suscetíveis aos efeitos do ácido acético, estudou-se qual seria o desempenho deste biocatalisador na reação em um sistema multicompetitivo composto de ácido cáprico, ácido oleico, etanol e *n*-octanol (sem ácido acético) em condição 1:1 cp. Analogamente, como as reações catalisadas por Lipozyme TL IM pareceram muito suscetíveis aos efeitos do etanol, estudou-se qual seria o desempenho deste biocatalisador na reação em um sistema multicompetitivo composto de ácido acético, ácido cáprico, ácido oleico e *n*-octanol (sem etanol) em condição 1:1 cp. E por fim, como as reações catalisadas por Novozym 435 demonstraram maior tolerância ao ácido acético em concentrações relativamente altas, mas não tão altas quanto nas sínteses individuais, estudou-se qual seria o desempenho deste biocatalisador na síntese de um sistema multicompetitivo com uma concentração bastante elevada de ácido acético (216 g L^{-1} , conforme o máximo descrito na literatura). O sistema multicompetitivo sem ácido acético em reação catalisada por Lipozyme RM IM atingiu 88,3% de conversão após 4 h de reação confirmando os efeitos deletérios do ácido acético, que provavelmente levou à inativação do biocatalisador nas concentrações estudadas. Este resultado também indica que seria possível adotar reações em sistema multicompetitivo com a Lipozyme RM IM, contanto que estes não tenham ácido de cadeia curta (podendo conter apenas álcool de cadeia curta) sobre este biocatalisador. O sistema multicompetitivo sem etanol em reação catalisada por Lipozyme TL IM atingiu 44,5% de conversão após 4 h de reação. Este resultado se aproxima do obtido com este biocatalisador na síntese do acetato de octila em condição 1:1 cp (38,3%), indicando que neste caso a presença do ácido acético ($57,7 \text{ g L}^{-1}$) continua limitando a cinética reacional no intervalo estudado. A reação em sistema multicompetitivo com concentração mais elevada de ácido acético (216 g L^{-1}) catalisada por Novozym 435 atingiu 55,6% de conversão após 4 h de reação. Esta conversão é similar à observada na síntese do acetato de octila em condição 1:1 cp (51,0%) no mesmo intervalo de tempo estudado, que tem concentração de ácido acético de 280 g L^{-1} . Este resultado indica que as altas concentrações de ácido acético reduzem as taxas reacionais promovidas pela Novozym 435 no intervalo estudado, provavelmente por inibição.

Considerando que a Novozym 435 foi o único biocatalisador apto a obter conversões próximas a 90% com o sistema multicompetitivo proposto (com quantidades equivalentes dos três ácidos e dois álcoois) no intervalo estudado, estudou-se a evolução da conversão ao longo do tempo do sistema multicompetitivo em comparação com as reações individuais, conforme mostrado na Figura 14. Nota-se, pela análise do gráfico (Fig. 14) que o comportamento cinético da reação em sistema multicompetitivo foi similar ao comportamento cinético das

reações de síntese dos ésteres de cadeia mais longa (caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila).

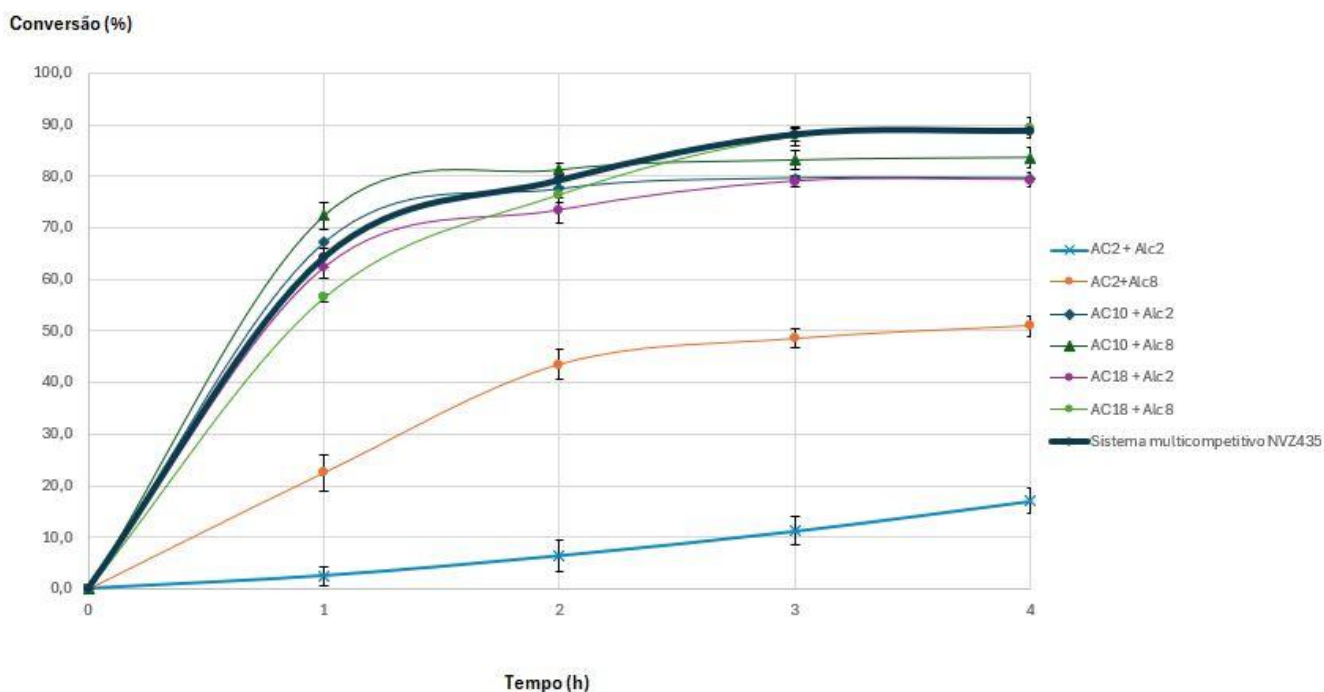


Figura 14. Evolução da conversão (%) dos ácidos à ésteres ao longo do tempo nas reações individuais de síntese do acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila e em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oléico com etanol e *n*-octanol. Todas as reações foram catalisadas por Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm), 50 °C, 100 U de carga de biocatalisador, na condição de razão molar ácidos:álcoois 1:1 cp (com peneira molecular).

Um estudo cinético mais detalhado do sistema multicompetitivo, visando a determinação da velocidade máxima da reação e as constantes cinéticas de Michaelis-Menten, não seria trivial tal como o é para esterificações (individuais) catalisadas por lipases imobilizadas (Chowdhury e Mitra, 2015; Foresti *et al.*, 2008; Garcia, T. *et al.*, 1999; Kuperkar *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2023; Paiva, Balcão e Malcata, 2000; Silva, da *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2021). Neste estudo tem-se um meio reacional complexo com múltiplos substratos em uma reação sem solvente. Alguns trabalhos da literatura ao estudar os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten em reações envolvendo matrizes complexas, como por exemplo, óleos vegetais (mistura de triglicerídeos), consideram o óleo como sendo um único substrato (uma única molécula). Esta premissa soa razoável para o caso dos óleos que tem uma composição de triglicerídeos de tamanho de cadeia similar, como por exemplo o óleo de coco, rico em triglicerídeos de 12 a 14 carbonos. O trabalho de Serrano-Arnaldos e co-autores (2021)

desenvolveu um modelo cinético simplificado para estudar a síntese de ésteres cetílicos a partir de uma mistura de ácidos de 12 a 18 carbonos no qual a mistura, para fins cinéticos, foi considerada como um único ácido (Serrano-arnaldos *et al.*, 2021). Contudo, a literatura não descreve (até onde foi pesquisado para esta tese) casos como a mistura ácida estudada (C2 - C10 - C18 em proporções equimolares) na qual há uma variação ampla de tamanho de cadeia, o que traz um obstáculo para o entendimento se a mistura gera alterações consideráveis na afinidade da enzima (K_m) pelos substratos no meio. Nossa tentativa de comparar a reação em sistema multicompetitivo com uma reação modelo baseada na hidrofobicidade (ácido nonanóico, C9, e *n*-pentanol, C5) atingiu resultado diretamente comparável apenas quando mediado por Novozym 435 devido à sua ampla tiposeletividade, mas não para as outras lipases imobilizadas testadas. O aprofundamento desta questão, contudo, está fora dos objetivos desta tese, que visou, essencialmente, identificar se as reações em sistema multicompetitivo podem ser mais eficientes que as reações individuais para obtenção de ésteres de diferentes tamanhos de cadeia por via biocatalítica, propondo um processo a partir deste conceito. Uma descrição mais aprofundada destes sistemas, tanto sob o aspecto cinético quanto pelo aspecto termodinâmico, pode ser estudada futuramente.

Em suma, baseado nos resultados discutidos pode-se sugerir que a reação em sistema multicompetitivo catalisada por Novozym 435 resultou em altas conversões devido a conjunção destes fatores – aumento da hidrofobicidade inicial do meio reacional e redução da concentração dos reagentes de cadeia curta com potencial efeitos danosos para a atividade enzimática. Estes efeitos são similares aos que podem ser obtidos nas sínteses com solventes hidrofóbicos. Desta forma, sistemas multicompetitivos tem potencial para conciliar a síntese de ésteres de cadeia curta sem solventes, beneficiando-se das vantagens das sínteses sem solventes para as métricas do processo. Até o momento, a discussão sobre as reações em sistema multicompetitivo e as reações individuais girou em torno da conversão dos ácidos em ésteres, sem levar em conta as concentrações de cada éster obtido. Sob a perspectiva da concentração dos ésteres formados, as reações em excesso estequiométrico resultam em concentrações menores de produto(s), ainda que atinja(m) conversão igual ou superior às reações em condição equimolar, já que o volume reacional é, em boa parte, ocupado pelo(s) álcool(is) excedente. Neste sentido, a avaliação desta métrica de processo estará focada em condições próximas da equimolaridade.

6.2 Sistema multicompetitivo e reações individuais – métricas de processo

O sistema multicompetitivo mediado por Novozym 435 apresentou conversões superiores a 70% em todas as condições testadas, comportamento similar ao observado nas reações com os ácidos mais hidrofóbicos – ácido cáprico e oleico. Esta observação reforça a hipótese de que a mistura dos ácidos e dos álcoois de diferentes tamanhos de cadeia, resultando em um meio reacional hidrofóbico e com concentração moderada dos reagentes de cadeia curta, propicia boa condição para a atuação desta lipase imobilizada, viabilizando a síntese do éster de cadeia mais curta (acetato de etila) sem solventes. A análise cromatográfica da reação em sistema multicompetitivo na condição 1:1 com remoção da água formada (1:1 cp) revela a formação de todos os ésteres previstos nas seguintes concentrações: 30,1 g L⁻¹ de acetato de etila, 56,9 g L⁻¹ de acetato de octila, 94,2 g L⁻¹ de caprato de etila, 204,6 g L⁻¹ de caprato de octila, 217,8 g L⁻¹ de oleato de etila e 243,2 g L⁻¹ de oleato de octila. Já na condição 1:2, a reação em sistema multicompetitivo obteve as seguintes concentrações de produto: 19,0 g L⁻¹ de acetato de etila, 47,4 g L⁻¹ de acetato de octila, 55,0 g L⁻¹ de caprato de etila, 131,2 g L⁻¹ de caprato de octila, 93,5 g L⁻¹ de oleato de etila e 193,0 g L⁻¹ de oleato de octila.

Como esperado, as concentrações de ésteres em 1:1 cp são superiores às observadas em 1:2 cp devido ao excesso estequiométrico dos álcoois nesta condição. Em 1:1 cp, as concentrações em g L⁻¹ foram crescentes, do éster de cadeia mais curta (acetato de etila) até o de cadeia mais longa (oleato de octila). A grande variação das concentrações se dá pela diferença de massa molar das moléculas em questão. Se consideradas em mol L⁻¹, as concentrações seriam, respectivamente: 0,34 mol L⁻¹ de acetato de etila, 0,33 mol L⁻¹ de acetato de octila, 0,47 mol L⁻¹ de caprato de etila, 0,74 mol L⁻¹ de caprato de octila, 0,74 mol L⁻¹ de oleato de etila e 0,68 mol L⁻¹ de oleato de octila. Já em 1:2 cp, percebe-se um favorecimento da formação dos ésteres octílicos em detrimento dos ésteres etílicos, já que a concentração do caprato de octila (0,46 mol L⁻¹) foi superior à do oleato de etila (0,30 mol L⁻¹) e a concentração do acetato de octila foi igual a concentração do caprato de etila (0,27 mol L⁻¹ para ambas). Este conjunto de resultados está de acordo com o discutido nos trabalhos de Parkin e co-autores (Arsan e Parkin, 2000b; Kuo e Parkin, 1996; Lee e Parkin, 2001, 2000), que discute que as diferenças de tiposeletividade das lipases também dependem de fatores extrínsecos (como por exemplo, a composição do meio reacional), não apenas da afinidade da lipase por um determinado substrato. Ainda que em 1:2 tenhamos a mesma quantidade molar de cada álcool, quando comparados entre si, a concentração de etanol no meio em 1:2 é

superior a presente em 1:1. Como o etanol tem alto potencial inibidor sobre as lipases, ligando-se reversivelmente com as lipases – inibição competitiva (Mangiagalli *et al.*, 2022; Robinson, 2015) – sua presença em maior quantidade no meio propiciou a formação mais lenta dos ésteres etílicos, favorecendo a formação dos ésteres octílicos no intervalo de tempo estudado (4 h). Neste sentido, a condição 1:1 cp é mais interessante para o processo por: i) maiores concentrações de ésteres; ii) melhor balanço entre a formação dos ésteres etílicos e octílicos.

Em uma situação ideal na qual não haja diferença de tiposeletividade pelo biocatalisador, seria esperada a formação da mesma quantidade de mol de cada um dos ésteres formados, conforme mostrado na Figura 6, no qual é possível ver qual seria a concentração máxima teórica de cada éster em uma situação hipotética de 80% de conversão dos ácidos à ésteres sem diferença de tiposeletividade pelo biocatalisador. Comparando as concentrações de cada éster determinadas por CG e convertendo-as em mol, temos uma forma simplificada de identificar quais produtos foram formados em maior quantidade, expressando quais substratos foram preferencialmente convertidos e quais reações foram favorecidas no meio. O total de ésteres formados no meio é então, a soma das concentrações individuais de cada éster formado, permitindo comparar as reações em sistema multicompetitivo (que formam vários ésteres simultaneamente) com as reações individuais (que formam um único éster).

Baixas conversões podem eventualmente estar associadas à altas concentrações de produto devido à ausência de solventes no meio. No entanto, não apenas a conversão ou a concentração do produto são importantes, mas também é preciso levar em conta a produtividade catalítica e a produtividade volumétrica. Por exemplo, na síntese do acetato de etila em reação individual, catalisada por Novozym 435 na condição 1:1 cp, atingiu-se conversão de 17,7%, que resulta em concentração de acetato de etila de 135 g L^{-1} . Ainda que esta concentração seja relativamente alta por se tratar de reação sem solvente, 85% do volume total ao término da reação são ocupados por reagente não-reagido, resultando em produtividade volumétrica (STY) de apenas $0,04 \text{ L L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ de acetato de etila por litro de reator. A produtividade catalítica desta síntese, conduzida com 100 U de Novozym 435 (equivalente a 1,3% em massa de carga de biocatalisador em relação a massa total do meio), é de apenas $9,1 \text{ g produto g}^{-1} \text{ biocatalisador}$.

Condições próximas à equimolaridade são desejáveis em termos de métricas de processo, não apenas em relação à concentração do(s) produto(s). Na condição equimolar (1:1

cp), a reação em sistema multicompetitivo alcança concentração total de $3,3 \text{ mol L}^{-1}$ de produtos, produtividade volumétrica de $0,23 \text{ L L h}^{-1}$ e produtividade catalítica de $77,9 \text{ g g}^{-1}$ por ciclo de reação; já na condição 1:2 (cp), o sistema multicompetitivo alcança concentração $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ de produtos, produtividade volumétrica de $0,16 \text{ L L h}^{-1}$ e produtividade catalítica de $63,3 \text{ g g}^{-1}$ por ciclo de reação. As demais métricas comparando reações individuais e as reações em sistema multicompetitivo estão apresentadas na Tabela 17.

Tabela 17: Métricas de processo das reações individuais entre ácidos e álcoois e das reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Novozym 435 (100 U) em frasco agitado.

| Reação | Razão molar | Conversão (%) | Concentração de éster | | Produtividade catalítica por ciclo | | STY | |
|-----------------------------------|-------------|---------------|-----------------------|-------------------------|------------------------------------|-------------------------|--------------------------------------|--|
| | | | (g L^{-1}) | (mol L^{-1}) | (g g^{-1}) | (mol g^{-1}) | ($\text{L L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) | ($\text{mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) |
| Ácido Acético + Etanol | 1:1 | 17,7 | 135,0 | 1,5 | 9,1 | 0,10 | 0,04 | 0,38 |
| | 1:2 | 7,5 | 38,1 | 0,4 | 3,8 | 0,04 | 0,01 | 0,10 |
| Ácido Acético + <i>n</i> -Octanol | 1:1 | 51,0 | 413,4 | 2,4 | 37,8 | 0,22 | 0,12 | 0,60 |
| | 1:2 | 89,6 | 416,9 | 2,4 | 44,9 | 0,26 | 0,12 | 0,60 |
| Ácido Cáprico + Etanol | 1:1 | 86,6 | 688,4 | 3,4 | 75,6 | 0,37 | 0,20 | 0,85 |
| | 1:2 | 93,1 | 601,6 | 3,0 | 54,2 | 0,27 | 0,17 | 0,75 |
| Ácido Cáprico + <i>n</i> -Octanol | 1:1 | 90,6 | 736,4 | 2,6 | 74,9 | 0,26 | 0,21 | 0,65 |
| | 1:2 | 92,8 | 520,2 | 1,8 | 61,4 | 0,22 | 0,15 | 0,45 |
| Ácido Oleico + Etanol | 1:1 | 78,5 | 650,0 | 2,1 | 70,8 | 0,23 | 0,19 | 0,53 |
| | 1:2 | 77,4 | 554,6 | 1,8 | 62,9 | 0,20 | 0,16 | 0,45 |
| Ácido Oleico + <i>n</i> -Octanol | 1:1 | 87,3 | 726,9 | 1,8 | 100,2 | 0,25 | 0,21 | 0,45 |
| | 1:2 | 87,3 | 545,5 | 1,4 | 60,1 | 0,15 | 0,16 | 0,35 |
| Sistema Multicompetitivo | 1:1 | 88,0 | 801,7 | 2,9 | 69,8 | 0,26 | 0,23 | 0,72 |
| | 1:2 | 89,1 | 539,1 | 2,2 | 63,3 | 0,26 | 0,16 | 0,55 |

Os dados referem-se apenas às sínteses estudadas com peneira molecular (1:1 cp e 1:2 cp) no meio reacional.

É possível observar que o sistema multicompetitivo apresenta métricas de desempenho superiores às dos ésteres de cadeia mais curta (acetato de etila e acetato de octila) individualmente e similares a dos ésteres de cadeia média e longa. Deve ser ressaltado que todas as métricas calculadas são influenciadas pela massa molar dos compostos envolvidos; logo, ésteres de cadeia média e longa geram indicadores numericamente maiores

em g L⁻¹, o que torna necessária a comparação em mol. A Tabela 17 também revela mais explicitamente o impacto do excesso estequiométrico nas métricas do processo, como em sínteses que alcançam conversões similares nas condições 1:1 e 1:2 – caprato de octila, oleato de etila, oleato de octila e as reações em sistema multicompetitivo. Ainda que a condição 1:2 na síntese do acetato de octila tenha atingido conversão muito superior à observada na condição 1:1, os indicadores de concentração de produto, produtividade catalítica e STY pouco se alteraram. Neste sentido, o ganho em conversão, isoladamente, não representa uma melhoria no processo. Na literatura é possível encontrar diversos estudos nos quais altas conversões de reagentes são atingidas mas em condições de excesso estequiométrico tão altas ou superiores a 1:3 (Aljawish *et al.*, 2019; Baek *et al.*, 2020; Corrêa *et al.*, 2016; Dai *et al.*, 2014; Nyari *et al.*, 2018; Pereira *et al.*, 2018; Sharma *et al.*, 2024; Vadgama, Odaneth e Lali, 2015) e que, se calculadas, indicariam métricas pouco atrativas para um processo industrial. Adicionalmente, as sínteses em que a diferença de conversão entre a condição 1:1 e 1:2 foi pequena (em torno de 5% ou inferior), reforçam a necessidade de se adotar razões molares próximas (ou igual) a equimolaridade para favorecer as métricas de concentração de produto e STY.

A maioria dos trabalhos na literatura reportam apenas a conversão obtida, o que dificulta a comparação direta entre as métricas mostradas na Tabela 17 e as obtidas em outros estudos da literatura. A Tabela 18 reúne alguns estudos de síntese enzimática de ésteres de cadeia curta, média e longa, e as métricas calculadas a partir dos dados apresentados nestes estudos.

Tabela 18: Comparativo de métricas de processo(em base molar) de sínteses enzimáticas de ésteres descritas na literatura utilizando lipases imobilizadas comerciais com as reações em sistema multicompetitivo.

| Reação | Biocat. | Conversão (%) | Concentração de éster (mol L ⁻¹) | Prod.cat. por ciclo (mol g ⁻¹) | STY (mol L ⁻¹ h ⁻¹) | REF. |
|--|-------------|---------------|--|--|--|---------------------------------|
| Ácido Fórmico + <i>n</i> -Hexanol* | Novozym 435 | 98,2 | 0,10 | 0,006 | 0,07 | (Seo <i>et al.</i> , 2021) |
| Ácido Acético + <i>n</i> -Butanol* | Novozym 435 | 90,0 | 0,27 | 0,042 | 0,13 | (Martins <i>et al.</i> , 2011) |
| Ácido Acético + <i>iso</i> -Pentanol | Novozym 435 | 89,0 | 3,05 | 0,15 | 0,38 | (Lorenzo <i>et al.</i> , 2023) |
| Ácido Propanóico + <i>iso</i> -Butanol | Novozym 435 | 92,5 | 2,62 | 0,063 | 0,26 | (Kuperkar <i>et al.</i> , 2014) |

| | | | | | | |
|--|-------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---|
| Ácido Butírico+ <i>iso</i> -Pentanol* | Lipozyme TL IM | 96,1 | 1,63 | 0,016 | 0,27 | (Anschau <i>et al.</i> , 2021) |
| Ácido Caprílico + <i>n</i> -Butanol | Novozym 435 | 92,0 | 2,73 | 0,14 | 0,54 | (Sose, Bansode e Rathod, 2017) |
| Ácido Nonanóico + <i>n</i> - Pentanol | Lipozyme RM IM | 86,1 | 0,75 | 0,21 | 0,30 | (Muniandy <i>et al.</i> , 2019) |
| Ácido Decanóico + <i>n</i> - Propanol | Fermase | 83,8 | 2,04 | 0,12 | 0,20 | (Parikh, Lanjekar e Rathod, 2019) |
| Ácido Decanodióico + <i>n</i> -Octanol | Novozym 435 | 99,0 | 1,03 | 0,10 | 0,41 | (Corrêa <i>et al.</i> , 2016) |
| Ácido Láurico + Etanol | Fermase CALB | 92,4 | 2,68 | 0,13 | 0,67 | (Gawas, Jadhav e Rathod, 2016) |
| Ácido Láurico + <i>n</i> -Hexanol* | Lipozyme IM-77 | 92,2 | 0,09 | 0,020 | 0,07 | (Chang <i>et al.</i> , 2005) |
| Ácido Mirístico + <i>iso</i> -Propanol | Novozym 435 | 87,6 | 0,62 | 0,020 | 0,12 | (Vadgama, Odaneth e Lali, 2015)Vadgama <i>et al.</i> , 2015 |
| Ácido Oleico + Metanol | Novozym 435 | 98,0 | 2,60 | 0,40 | 0,11 | (Martinez-Garcia <i>et al.</i> , 2024) |
| Ácido Esteárico + Etanol | Novozym 435 | 92,0 | 1,54 | 0,18 | 0,06 | (Pereira <i>et al.</i> , 2018) |
| Ácido Esteárico + <i>n</i> -Butanol | Novozym 435 | 92,0 | 1,90 | 0,21 | 0,08 | (Pereira <i>et al.</i> , 2018) |
| Sistema Multicompetitiv o | Novozym 435 | 88,0 | 2,96 | 0,26 | 0,72 | Este trabalho |

*Sínteses em presença de solventes

Pelos dados da Tabela 18 é possível notar que a reação em sistema multicompetitivo aqui estudado tem métricas de processo superiores às descritas na literatura nas sínteses individuais de ésteres de cadeia curta, média ou longa. A coleta de estudos para esta comparação, ainda que não englobe moléculas iguais às obtidas no presente estudo, priorizou moléculas de diferentes tamanhos de cadeia sintetizadas apenas com lipases imobilizadas comerciais. Este critério foi adotado para facilitar a comparação dos dados de produtividade catalítica, já que a carga de biocatalisador tem grande impacto no custo dos processos biocatalíticos. A produtividade catalítica por ciclo da reação observada em sistema multicompetitivo na condição 1:1 cp (0,26 mol g⁻¹) só é superada pelo estudo de Martinez-Garcia e co-autores (2024) na síntese do oleato de metila (0,40 mol g⁻¹). Contudo, como este estudo adota uma carga de biocatalisador bastante reduzida (0,75% m/m total dos substratos),

o tempo de reação para atingimento do máximo de conversão é bastante longo (> 24 h) o que impacta a produtividade volumétrica (Martinez-Garcia *et al.*, 2024). O estudo conduzido por estes autores não explora em maior profundidade este aspecto, mas é possível verificar pelos dados mostrados no trabalho que as métricas de processo seriam bastante favorecidas caso a reação fosse interrompida antes (por exemplo, em 5 h de reação, com cerca de 89% de conversão). As maiores conversões não estão diretamente associadas aos melhores resultados de métricas de processo, já que as métricas dependem diretamente da razão molar ácido:álcool, da carga de biocatalisador e do tempo de reação. Para exemplificar, pode-se mencionar o estudo de Côrrea e co-autores (2016), que obtiveram 99% de conversão na síntese do sebacato de dioctila; esta marca foi alcançada com excesso estequiométrico ácido:álcool (1:5), o que levou a uma concentração de produto de $1,03 \text{ mol L}^{-1}$ com carga de biocatalisador elevada (5% m/m do ácido empregado como reagente, ácido sebácico), resultando em uma produtividade catalítica de apenas $0,10 \text{ mol g}^{-1}$ (Corrêa *et al.*, 2016). Estes resultados demonstram que ainda que uma determinada síntese possa ser considerada matematicamente otimizada em termos de conversão, as demais métricas não apontam para processos potencialmente viáveis, pois dependem de outros parâmetros reacionais.

Ainda que a comparação da reação em sistema multicompetitivo com os dados da literatura demonstrem a eficiência deste sistema em relação às reações individuais, é preciso também estabelecer uma base comparativa com a realidade industrial. Tüfvesson e colaboradores (2011) sugerem que para a produção de especialidades químicas (com valor de venda em escala industrial a partir de 5 USD kg^{-1}), a produtividade catalítica deve ser superior a 400 g de produto por g de biocatalisador imobilizado (Tufvesson *et al.*, 2011a). Ainda que as produtividades catalíticas calculadas nesta etapa do trabalho estejam bem abaixo do patamar sugerido, ressalta-se que as produtividades calculadas não consideraram o reuso do biocatalisador, contando apenas um único ciclo de reação, ou seja, um uso único da mesma carga de biocatalisador. Desta forma, para a reação em sistema multicompetitivo 1:1 cp ultrapassar o nível mínimo de produtividade catalítica preconizado, seriam necessários 6 reusos sequenciais da mesma carga de biocatalisador. Considerando os dados de reuso da literatura apresentados na Tabela 10, vê-se que o atingimento desta meta de reuso não é distante da realidade observada na maioria dos estudos de síntese enzimática. Tendo em vista esta meta de produtividade catalítica, não foram investigadas cargas de biocatalisador superiores a 1,3% m/m de Novozym 435 (100 U), já que estas levariam a uma redução da produtividade catalítica do processo por ciclo e a um aumento da necessidade de

reusossequenciais do biocatalisador. Ao desconsiderar a produtividade catalítica, muitos trabalhos na literatura adotam cargas de biocatalisador tão altas como 5% m/m ou superiores (Chowdary, Ramesh e Prapulla, 2000; Corrêa *et al.*, 2016; Friedrich *et al.*, 2012; Garcia, T *et al.*, 1999; Güvenç, Kapucu e Mehmetoğlu, 2002; Ikeda e Kurokawa, 2001; Kuperkar *et al.*, 2014; Lorenzo *et al.*, 2023; Santos *et al.*, 2007; Sjöblom *et al.*, 2017) em condições consideradas como otimizadas, que se mostram pouco realistas quando analisadas sob uma ótica de processo industrial, tendo em vista o custo médio de lipases imobilizadas comerciais. O aumento de carga de biocatalisador, teoricamente, não influencia a conversão atingida pela reação, afetando apenas a cinética da reação. Contudo, vários estudos medem a conversão da reação em intervalos de tempo anteriores ao atingimento do equilíbrio da reação e, dentro destes intervalos de tempo, variações da carga de biocatalisador representam na prática uma variação na conversão medida, por ocasião da variação da taxa reacional. No entanto, diversos estudos mostram que aumentos na carga de biocatalisador acima de determinado nível não representam ganhos em conversão para o processo estudado (Aljawish *et al.*, 2019; Kuperkar *et al.*, 2014; Parikh, Lanjekar e Rathod, 2019; Sousa *et al.*, 2020; Vadgama, Odaneth e Lali, 2015; Yu *et al.*, 2019). Por outro lado, a redução da carga a níveis muito baixos, aumenta o tempo de reação e pode gerar alguma redução observável na conversão dentro do intervalo estudado, devido à maior suscetibilidade do biocatalisador sofrer inibição, já que este está em baixa concentração em um meio com alta concentração de substratos, como nos casos das sínteses sem solvente (Sousa *et al.*, 2021c). O aumento da carga de biocatalisador precisa representar claras vantagens em termos da redução do tempo de reação e/ou do aumento da capacidade de reuso, conforme discutido no artigo de Sousa e co-autores (2021) (Sousa *et al.*, 2021a).

O artigo de Tüfvesson e colaboradores (2011) também sugere que a contribuição percentual do biocatalisador no custo do produto deve estar limitada a 5%, o que para uma especialidade química que custa 5 USD kg⁻¹, representaria 0,25 USD de biocatalisador por kg de produto (Tufvesson *et al.*, 2011a). Tendo em vista o custo de mercado da Novozym 435 (Tabela 12) e a carga de biocatalisador estudada até então, neste contexto seriam necessários 50 reusos sequenciais da mesma carga de biocatalisador, uma meta bastante desafiadora. Em frasco agitado, foram observados apenas 3 reusos sequenciais sem perda de atividade da Novozym 435 (Fig. 15) como biocatalisador do sistema multicompetitivo na condição ácidos:álcoois 1:1.

Para verificar a influência da composição do meio reacional na capacidade de reuso da Novozym 435, o reuso em sistema multicompetitivo foi comparado com duas reações individuais – a síntese do acetato de octila e a síntese do oleato de octila, em condição de razão molar ácido:álcool 1:1 para a reação do oleato de octila e 1:2 para a reação do acetato de octila, 100 U de carga de biocatalisador, 50 °C, 200 rpm, 30% m/m de peneira molecular e 4 horas de reação para ambas (Figura 15). Tanto na síntese do acetato de octila quanto na do oleato de octila, observou-se queda na conversão superior a 10% após 3 reações sequenciais. A presença da peneira molecular em todos os testes pode ter sido preponderante para que os 3 meios reacionais avaliados, bastante diferentes entre si, tivessem resultados iguais de reuso. Desta forma, os testes foram refeitos sem a presença da peneira molecular, revelando que a síntese do acetato de octila apresentou grande queda na conversão final logo no segundo experimento (passando de 51,0% inicialmente para 17,8% na segunda reação sequencial), o que na prática significa que o biocatalisador não pode ser reusado nesta síntese. Já na síntese do oleato de octila, 8 reações sequenciais sem considerável queda da conversão foram possíveis de serem realizadas com a mesma carga de biocatalisador. Esse teste simples indica que as sínteses dos ésteres de cadeia longa representam uma condição menos severa para a atuação catalítica da Novozym 435, permitindo a manutenção de sua atividade por um número maior de ciclos reacionais.

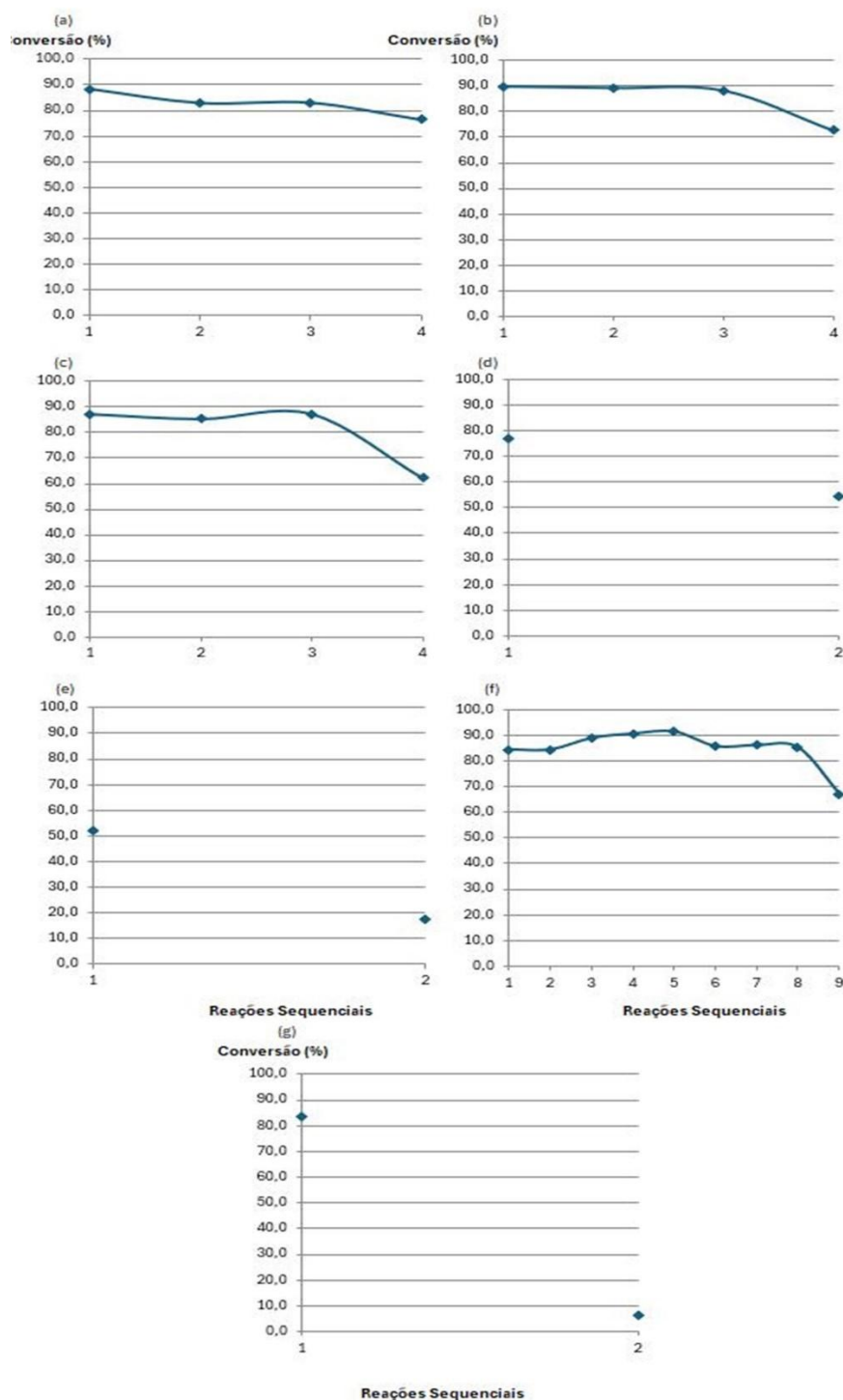
A concentração elevada do ácido acético na síntese individual do acetato de octila, somada aos efeitos da temperatura da reação e dos choques mecânicos entre as partículas do biocatalisador, pode ter sido responsável por não permitir o reuso da Novozym 435 nesta síntese e neste esquema reacional. Além disso, a água formada no meio reacional pode ter contribuído para a redução do pH do microambiente do biocatalisador, prejudicando a atividade catalítica da Novozym 435. Se por um lado, a presença da peneira molecular dificultou o reuso do biocatalisador por um número maior de ciclos, por outro lado, sua ausência também prejudicou a atuação do biocatalisador na presença do ácido acético. Um teste realizado com a reação em sistema multicompetitivo 1:1 sp também apresentou grande variação de conversão já na segunda reação sequencial, passando de 70,7% para 54,6%, o que significa que nesta condição, a Novozym 435 também não pode ser reusada (Fig. 15), cuja justificativa possivelmente está associada com a água que permanece no meio e contribui para a dissociação do ácido acético. Adicionalmente, o reuso na síntese do caprato de etila também foi estudado na ausência de peneira molecular (1:1 sp), revelando grande queda na conversão logo na segunda reação sequencial (de 82,4% para 16,3%), tal como no caso da síntese do

acetato de octila. Isto indica mais um aspecto desafiador das sínteses de ésteres de cadeia curta (e nas de cadeia média/longa que envolvam um reagente de cadeia curta) em meios sem solvente – os efeitos da concentração elevada de reagentes de cadeia curta sobre a capacidade de reuso do biocatalisador. Desta forma, as reações em sistema multicompetitivo, ao reduzir a concentração destes podem vir a favorecer o reuso das lipases imobilizadas em certos casos.

Em todas as reações estudadas na presença de peneira molecular foi observado que o meio reacional ficou amarelado ao término da reação, conforme mostrado na Figura 16. A própria peneira molecular, ao ser adicionada ao meio reacional já adquire uma coloração marrom clara, e esta coloração aos poucos vai passando para o meio reacional. Já nas reações sem peneira molecular, contendo apenas o biocatalisador imobilizado, o meio reacional permaneceu incolor e transparente. Este fato representa uma desvantagem deste esquema reacional (frasco agitado orbitalmente) com a peneira molecular utilizada (Merck), já que o amarelamento dos ésteres significa uma contaminação destes. Como ésteres podem vir a ser parte de formulações (cosméticos, alimentos, resinas), o ideal é que eles não afetem a coloração final do produto, que é provida por corantes ou pigmentos (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Khan e Rathod, 2015). Esta contaminação da coloração é antagônica a um dos objetivos da biocatálise aplicada à ésteres, que pretende a obtenção de produtos de maior pureza e processos mais simples pós-reação do que os obtidos por catálise química.

Assim, a presença de peneira molecular no meio reacional em frasco agitado é necessária para permitir o reuso do biocatalisador tanto nas reações em sistema multicompetitivo com em reação individual com ácido de cadeia curta estudada. Contudo, sua presença limita a capacidade de reuso (abaixo do necessário para as métricas do processo) e prejudica o aspecto do meio reacional final. Logo, outras formas de remoção da água formada na reação devem ser estudadas para superar estes gargalos.

Figura 15. Variação da conversão (%) dos ácidos à ésteres em reações seqüenciais com a mesma carga de biocatalisador para avaliação do reuso da Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm) em diferentes condições reacionais, com dados de concentração dos reagentes de cadeia curta e produtividade catalítica em cada caso. (a) Reação em sistema multicompetitivo 1:1 cp (b) Síntese do acetato de octila 1:2 cp (c) Síntese do oleato de octila 1:1 cp (d) Reação em sistema multicompetitivo 1:1 sp (e) Síntese do acetato de octila 1:2 sp; (f) Síntese do oleato de octila 1:1 sp; (g) Síntese do caprato de etila 1:1 sp. Todas as reações foram catalisadas por Novozym 435 em frasco agitado (200 rpm), 50 °C, 100 U de carga de biocatalisador.



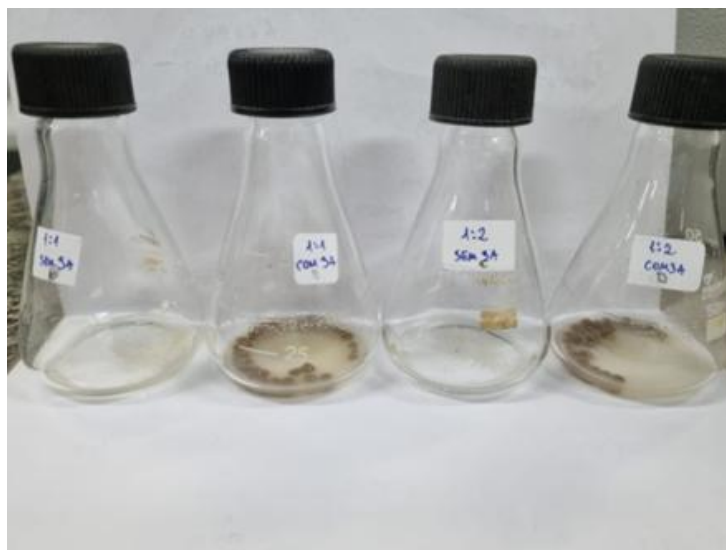


Figura 16. Aspecto do meio reacional ao término das reações (após 4 h) em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico, oléico com etanol e *n*-octanol nas condições 1:1 e 1:2 com e sem presença de peneira molecular 3Å catalisadas por Novozym 435.

Em suma, a avaliação das métricas do processo nos levam aos seguintes objetivos de desempenho do processo: i) aumentar o reuso da Novozym 435; ii) garantir remoção eficiente da água formada sem contaminação do meio reacional; iii) aumentar o rendimento da reação e/ou reduzir o tempo de reação. O atingimento destes três objetivos é capaz de incrementar todas as métricas de processo avaliadas. O caminho escolhido para tal foi, então, estudar um novo esquema reacional para as reações em sistema multicompetitivo, a saber, o reator de coluna de bolhas.

6.3 Desempenho do sistema multicompetitivo – desenvolvimento de protótipo de reator de coluna de bolhas e variação de parâmetros reacionais

Como o reuso do biocatalisador é um fator crítico para a viabilidade econômica de um processo biocatalítico, os reatores de coluna de bolhas são descritos na literatura como alternativas simples e de baixo custo para favorecer o reuso das lipases imobilizadas (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013; Baum *et al.*, 2016; Hilterhaus, Thum e Liese, 2008). Baseado no trabalho de Liu *et al.* (2016) (Liu *et al.*, 2016), um protótipo de reator foi desenhado e confeccionado em vidro, conforme mostrado na Figura 17. Sua confecção foi realizada pela empresa Vidroquímica Ltda. (Rio de Janeiro, RJ). A coluna de vidro foi

desenhada com relação de aspecto (base:altura) 1:4 e volume útil de 30 mL, considerando que a literatura a respeito destaca como adequadas para bioprocessos as relações de aspecto entre 1:2 a 1:5. A manutenção da temperatura do reator é realizada por meio de um recipiente externo cilíndrico de vidro, dentro do qual a coluna de bolhas está montada. Este recipiente é preenchido com água, encamisando a coluna de bolhas e, sob uma placa de aquecimento e agitação, a temperatura do banho pode ser ajustada. Testes realizados mostram que a variação de temperatura do meio reacional dentro da coluna de bolhas com a agitação em funcionamento e a da água no recipiente externo é de cerca de ± 2 °C. A base do reator contém vidro sinterizado com tamanho de poro não uniforme, variando de 4 a 20 μm , responsável por formar as bolhas de gás na coluna. A entrada do gás (ar comprimido) é feita por um tubo de vidro, com uma válvula de teflon similar a de uma bureta. O topo do reator foi acoplado a um tubo de vidro, preenchido com peneira molecular 3Å (ou outro material adsorvente) para absorção da água formada na reação que é carregada pelas bolhas ascendentes. Cerca de 4 g de peneira molecular são necessárias para preencher este tubo. Acima do tubo, por meio de uma conexão em vidro esmerilhada, foi colocado um condensador de bolas, para permitir o refluxo dos componentes mais voláteis (etanol e acetato de etila) para o reator.

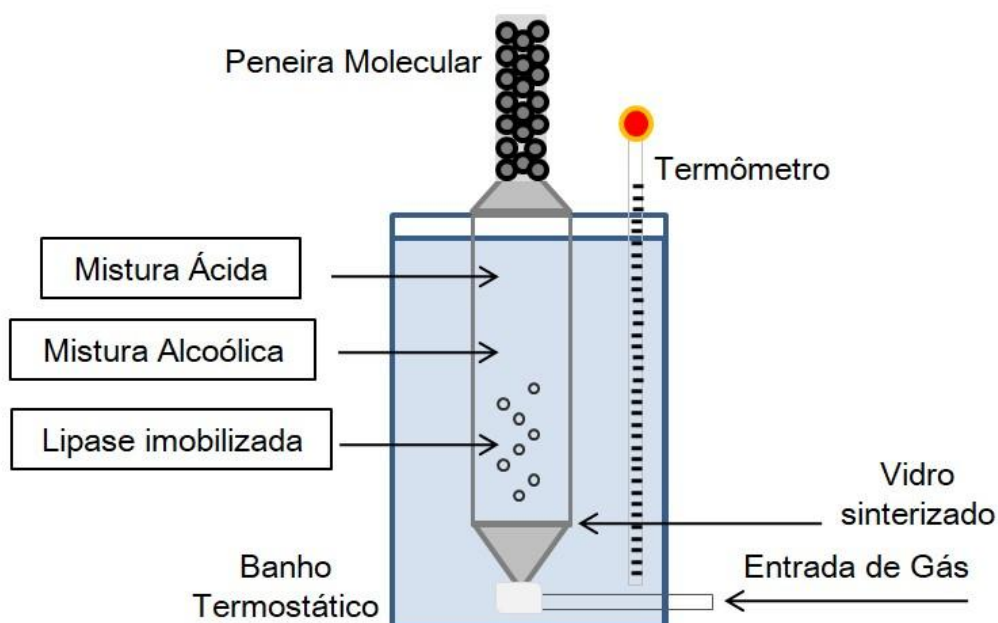




Figura 17. (a) Diagrama esquemático do protótipo de reator de coluna de bolhas desenvolvido no LABIC/INT ; (b) protótipo de reator de coluna de bolhas em utilização

O primeiro teste realizado no protótipo de reator de coluna de bolhas foi na condição considerada mais promissora da reação em sistema multicompetitivo – razão molar 1:1, carga de biocatalisador 1,3% (m/m total) Novozym 435, à 50 °C por 4 h de reação, utilizando-se o mesmo volume reacional (cerca de 3 mL) que nos frascos agitados. Este teste foi realizado em sistema sem refluxo. A intensidade da agitação foi controlada manualmente, de modo a evitar a formação de zonas mortas sem agitação do biocatalisador pelo líquido. Foram coletadas amostras periodicamente para avaliação do índice de acidez ao longo da reação e para determinação das concentrações dos reagentes e produtos por CG. Após 1 h de reação, atingiu-se conversão de 57,2% no protótipo, ao passo que em frasco agitado as conversões médias após 1 h de reação na mesma condição reacional chegaram próximas em 64,3% . Ao final de 4 h de reação, a reação no protótipo chegou a 70,7% enquanto no frasco agitado chegou a 88,8% com presença de peneira molecular no meio. A avaliação das concentrações dos reagentes e produtos por CG, contudo, revelou um problema – após 1 h de reação praticamente não havia mais etanol no meio reacional; sua concentração reduziu-se a 10% do valor inicial e não foi identificado o pico correspondente ao acetato de etila na reação em nenhum dos intervalos de tempo avaliados. As perdas do etanol e do acetato de etila, que tem

pontos de ebulição menores que a água, pode ter sido causada pela combinação da temperatura da reação (50 °C) com o borbulhamento do sistema. A perda do etanol limitou as conversões parciais e final da reação, fazendo com que o *n*-octanol fosse o reagente limitante da reação – a área do pico do *n*-octanol no CG reduziu-se em 99% entre o tempo inicial e final da reação – deixando a mistura dos ácidos em excesso estequiométrico, o que pode ser prejudicial para a atividade enzimática devido a redução do pH do microambiente enzimático.

A condição reacional 1:1, à 50 °C, com 1,3% de Novozym 435 foi então reproduzida no protótipo com o sistema de refluxo acoplado, partindo do mesmo volume reacional anteriormente estudado. Após 4 h, a reação atingiu 71,5% de conversão, marca ainda inferior à observada em frasco agitado. A presença de etanol e acetato de etila foram confirmadas por análise em CG após 1 h de reação (10,7 g L⁻¹), indicando que o sistema de refluxo foi eficaz em reter os compostos mais voláteis no sistema reacional. Os resultados de conversão obtidos foram similares aos obtidos no frasco agitado na condição 1:1 sem peneira molecular (75,7%), o que nos levou a investigar a efetividade da remoção de água no protótipo e o deslocamento do equilíbrio químico na direção da síntese. Alterações na coluna de líquido, com volumes reacionais de 7 e 15 mL, resultaram respectivamente em 75,4% e 73,0% de conversão após 4 h de reação, indicando que a alteração do volume reacional não influenciou sobremaneira o desempenho do processo no protótipo de reator de coluna de bolhas. A alteração do material absorvente no topo da coluna (CaCl₂ ao invés de peneira molecular 3Å) também manteve a conversão após 4 h no mesmo patamar – 71,3% após 4 h de reação.

A diferença de desempenho da reação nos dois esquemas reacionais foi então avaliada a partir da eficiência da remoção da água formada no meio. Foram analisados os teores de água por titulação Karl Fisher ao longo das reações conduzidas nos dois esquemas reacionais – protótipo de reator de coluna de bolhas e no frasco agitado (com peneira molecular) – na condição 1:1. Enquanto no frasco agitado (1:1 cp), o teor de água presente após 1 h de reação foi de 5898 ppm, no protótipo de reator de coluna de bolhas o teor de água foi 0 ppm (análise em duplicata); após 2 h em frasco agitado houve uma redução para 3497 ppm, enquanto no protótipo de reator de coluna de bolhas o teor de água manteve-se em zero. Estes dados atestam a eficácia do protótipo em remover a água formada, contudo a completa ausência de água no meio reacional pode ter sido a responsável pela diferença na conversão da mesma reação nos dois esquemas reacionais estudados. A literatura discute que um teor mínimo de água em meio orgânico é necessário para manter a atividade catalítica das lipases (Adlercreutz, 2013; Colombié *et al.*, 1998; Halling, 1990; Halling *et al.*, 2004; Klibanov,

2001). No caso da Novozym 435, o trabalho de Duan e co-autores (2010) demonstrou rendimentos crescentes na síntese de dioleína com atividades termodinâmicas de água crescentes até certo nível em que o favorecimento da hidrólise começou a ser observado (Duan, Du e Liu, 2010). Já o trabalho de Banik e co-autores (2017) estudando a síntese do butirato de etila em MTBE demonstrou que a atividade catalítica da Novozym 435 foi mais alta no nível mais baixo de atividade termodinâmica de água testado (0,1), citando outros exemplos na literatura com tendência similar (Banik *et al.*, 2017). O trabalho de Lue e co-autores (2005) na síntese de cinamato de oleila com Novozym 435 também demonstrou a maior atividade catalítica de Novozym 435 nas mais baixas atividades termodinâmicas de água testadas (0,05 e 0,11) (Lue *et al.*, 2005). Contudo, nenhum destes estudos considerou avaliar meios reacionais anidros, o que reforça a hipótese aqui levantada sobre a necessidade de um teor mínimo de água no meio reacional para manutenção da atividade catalítica da Novozym 435.

Tendo em vista a dificuldade em se atingir conversões próximas ou superiores a 90% na condição reacional estudada no protótipo de reator de coluna de bolhas – razão molar ácidos:álcoois 1:1 – avaliou-se então razões molares intermediárias entre 1:1 e 1:2. Esta avaliação visou aumentar a conversão geral do sistema multicompetitivo pelo deslocamento mais efetivo do equilíbrio em direção a síntese, de forma conjugada com a manutenção de métricas de processo satisfatórias (altas concentrações de produtos, alta STY e alta produtividade catalítica). Neste sentido, estudou-se razões molares ácidos:álcoois entre 1:1,1 e 1:1,5, que representam excessos estequiométricos de 10 a 50% dos álcoois em relação aos ácidos, bem como a própria condição 1:2. Os dados obtidos são mostrados na Figura 18.

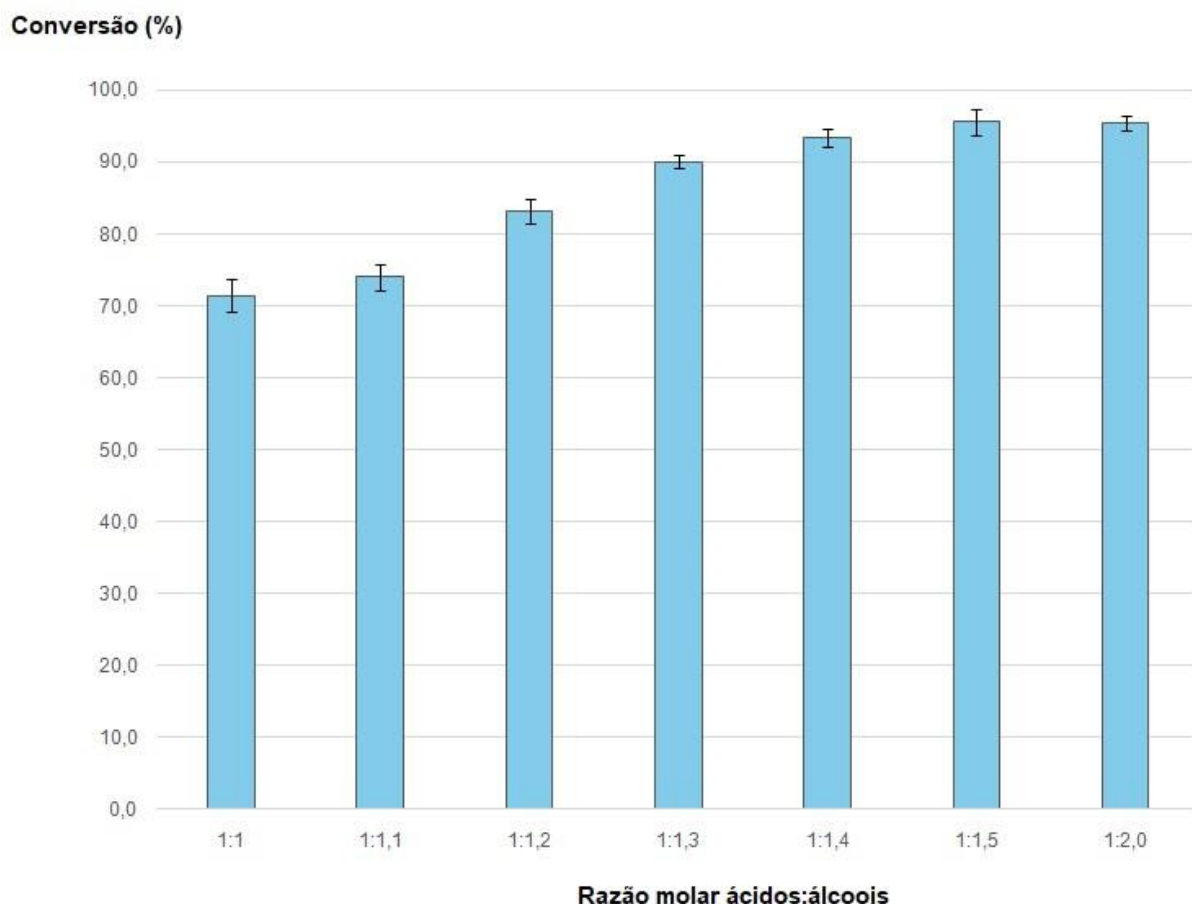


Figura 18. Variação da conversão em função da razão molar nas reações em sistema multicompetitivo no protótipo de reator de coluna de bolhas. Reações conduzidas por 3 h, à 50 °C, carga de biocatalisador Novozym 435 1,3% m/m.

A Figura 18 revela que a condição 1:2 do sistema multicompetitivo no protótipo de reator de coluna de bolhas supera a marca atingida no frasco agitado, chegando a 95,5% de conversão em 3 h de reação, enquanto em frasco agitado o máximo atingido foi 89,1% em 4 h de reação. O teor de água na condição 1:2 ao término da reação no protótipo de reator de coluna de bolhas foi de apenas 911 ppm, ao passo que no frasco agitado foi de 9125 ppm com peneira molecular e 14163 ppm sem peneira molecular (Figura 13 (b)). Neste sentido, atesta-se a eficácia do protótipo de reator de coluna de bolhas na remoção da água formada na reação em sistema multicompetitivo. Nota-se que, diferentemente da condição 1:1, na condição 1:2 o teor de água não chega a zero, o que pode estar relacionado com o excedente de etanol no meio reacional, que tem capacidade de dissolver a água formada, dificultando sua remoção completa do reator. O atingimento de conversões próximas às obtidas no frasco agitado nas condições 1:1 cp, 1:2 sp e 1:2 cp (>84,0%) só se deram a partir da razão molar ácidos:álcoois 1:1,2 no protótipo de reator de coluna de bolhas. Ou seja, a despeito da

eficiência do protótipo, o atingimento do mesmo nível de conversão que o obtido em frasco agitado requer excesso estequiométrico dos álcoois. O excesso estequiométrico dos álcoois (mais especificamente do etanol) provavelmente permitiu maior dissolução da água formada nomeio reacional e permanência de traços de água no meio, colaborando com a manutenção da atividade catalítica da Novozym 435 durante a reação. Observações similares são discutidas nos trabalhos de Colombie e co-autores (1998) (Colombié *et al.*, 1998) e Sandoval e co-autores (2002) (Sandoval *et al.*, 2002) para a Lipozyme RM IM, nas quais excedentes de etanol nas sínteses de oleato de etila colaboraram com a manutenção de níveis de hidratação mais elevados e maior atividade catalítica.

É possível verificar, pelos dados mostrados na Figura 18, que a condição 1:1,5 atingiu a maior conversão dentre as condições testadas (95,7%) ligeiramente superior à obtida em 1:2. Contudo, a adoção de excesso estequiométrico prejudica as métricas de processo como já mostrado nasTabela 17 e 18. Os impactos do excesso estequiométricodos álcoois neste estudo de variação da razão molar no protótipo de reator de coluna de bolhas foram calculados e apresentados na Tabela 19.

Tabela 19: Métricas de processo das reações em sistema multicompetitivo catalisadas por Novozym 435 em protótipo de reator de coluna de bolhas após 3 h de reação e em frasco agitado após 4 h de reação.

| Reação | Razão molar | Conversão da reação (%) | Concentração de ésteres (mol L ⁻¹) | Produtividade de catalítica por ciclo (mol g ⁻¹) | STY (mol L ⁻¹ h ⁻¹) |
|--|-------------|-------------------------|--|--|--|
| Sistema Multicompetitivo (protótipo de reator de coluna de bolhas) | 1:1 | 71,5 | 2,4 | 0,21 | 0,80 |
| | 1:1,1 | 74,1 | 2,4 | 0,21 | 0,80 |
| | 1:1,2 | 83,2 | 2,6 | 0,23 | 0,87 |
| | 1:1,3 | 90,1 | 2,7 | 0,25 | 0,91 |
| | 1:1,4 | 93,5 | 2,8 | 0,25 | 0,92 |
| | 1:1,5 | 95,7 | 2,7 | 0,23 | 0,91 |
| | 1:2 | 95,5 | 2,4 | 0,22 | 0,79 |
| Sistema Multicompetitivo (frasco agitado) | 1:1 | 88,0 | 2,9 | 0,26 | 0,72 |

Os dados foram apresentados em mol ao invés de massa (g) ou volume (L) por não terem sido analisadas as concentrações de cada um dos 6 ésteres formados em cada uma das condições reacionais testadas no protótipo de reator de coluna de bolhas.

Fica novamente evidente, pelos dados da Tabela 19, que o simples aumento da conversão não implica melhoria das demais métricas de processo, afetadas pela diluição da concentração dos ésteres formados em decorrência do excesso estequiométrico. É possível avaliar o impacto positivo do STY pela redução de 1 h de reação no protótipo de reator de coluna de bolhas (3 h) em relação ao frasco agitado (4 h), no qual todas as condições com excesso estequiométrico superaram, neste quesito, a condição equimolar conduzida no frasco agitado. Isso se deve ao equilíbrio químico da reação ter sido atingido mais rapidamente no protótipo de reator de coluna de bolhas do que no frasco agitado – após 3 h de reação não se observou mais alterações na conversão dos ácidos – em consonância com o que reporta a literatura a respeito da melhoria nas taxas reacionais observadas neste reator quando comparado com reatores agitados (Baum *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2016). Este incremento cinético pode estar relacionado tanto com a efetiva dispersão do biocatalisador no meio reacional, favorecendo o contato entre as fases quanto pela eficiente remoção da água formada no meio reacional (Liu *et al.*, 2016). A condição 1:1,3 situa-se em um patamar intermediário que concilia um excesso estequiométrico relativo (30%) com concentração de produto e produtividade volumétrica dentre as mais altas no conjunto de condições testadas. Neste sentido, esta condição foi escolhida para os estudos posteriores no protótipo de reator de coluna de bolhas.

A condição 1:1,3 quando avaliada em intervalos de 1 h, revelou que a conversão atinge a marca de 87,8% de conversão após 2 h de reação. Na hora seguinte atinge 90,1% de conversão. Tendo em vista a pequena variação da conversão dos ácidos à ésteres neste intervalo, os cálculos das métricas referentes a 2 h de reação e conversão de 87,8% revelam que uma ligeira redução da concentração de produto, passando de 2,73 para 2,67 mol L⁻¹ (redução de 2,2%) e um grande aumento da STY, passando de 0,91 para 1,33 mol L⁻¹ h⁻¹ (aumento de 46,2%). Este ganho em produtividade volumétrica tende a impactar positivamente os estudos preliminares de viabilidade, permitindo a adoção de reatores de menor capacidade e, conseqüentemente, de menor custo de instalação e de operação, para uma mesma escala de produção de ésteres. Neste sentido, definiu-se o tempo de reação de 2 h para esta reação para estudo do reuso do biocatalisador, na modelagem e simulação do processo e no estudo preliminar da viabilidade técnico-econômica. A condição 1:1,3 após 2 h de reação resultou nas seguintes concentrações de ésteres: 26,7 g L⁻¹ de acetato de etila, 82,5 g L⁻¹ de acetato de octila, 94,2 g L⁻¹ de caprato de etila, 197,4 g L⁻¹ de caprato de octila, 128,7 g L⁻¹ de oleato de etila e 217,2 g L⁻¹ de oleato de octila. É possível observar que na condição

avaliada há um favorecimento da formação dos ésteres octílicos em relação aos ésteres etílicos, sendo que estes últimos são formados mais lentamente devido aos efeitos inibitórios do etanol.

Para complementar a comparação entre as reações em frasco agitado e o protótipo do reator de coluna de bolhas, foram avaliadas as reações dos sistemas multicompetitivos nas condições 1:1 e 1:2 catalisadas por Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM, utilizando proporcionalmente as mesmas cargas de biocatalisador estudadas nas reações em frasco agitado. As reações na condição 1:1 atingiram, respectivamente, 45,6% e 0,0% de conversão após 4 h com Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. Com a Lipozyme RM IM, observou-se aumento de 14,7% da conversão em relação ao frasco agitado (condição 1:1 cp), e com a Lipozyme TL IM o resultado manteve-se sem conversão nos dois esquemas reacionais. Já as reações em sistema multicompetitivo na condição 1:2 atingiram, respectivamente, 86,6% e 59,0% com Lipozyme RM IM e Lipozyme TL IM. Com a Lipozyme RM IM, observou-se aumento de 33,7% da conversão e com a Lipozyme TL IM observou-se aumento de 6,3% na conversão ao comparar ambos resultados com o obtido em frasco agitado (condição 1:2 cp).

A reação em sistema multicompetitivo conduzida em frasco agitado e condição 1:1 apresentou métricas de concentração de produto e produtividade catalítica (por ciclo) superiores ao reator de coluna de bolhas na condição de excesso estequiométrico 1:1,3, conforme mostrado na Tabela 19. Porém, este esquema reacional mostra desvantagens contundentes em relação ao protótipo de reator de coluna de bolhas – baixa capacidade de reuso do biocatalisador, dificuldade de separação da peneira molecular e do biocatalisador e contaminação (amarelamento) dos produtos formados. As duas últimas desvantagens citadas podem ser superadas quando as reações ocorrem no protótipo de reator de coluna de bolhas. Assim, um estudo de reuso nesta condição foi realizado nos dois esquemas reacionais.

6.4 Estudo do reuso do biocatalisador em sistema multicompetitivo com reator de coluna de bolhas

Esta etapa visou identificar se a adoção tanto do sistema multicompetitivo para síntese de ésteres de diferentes tamanhos de cadeia, quanto a condução deste processo em um protótipo de reator de coluna de bolhas propiciam alta capacidade de reuso do biocatalisador em bateladas sequenciais ou elevado número de horas de operação em sistemas contínuos. Para identificar este parâmetro, é necessário combinar a quantidade de reusos com o custo do

biocatalisador e o tempo de reação, pois a questão principal do reuso é identificar a contribuição do custo do biocatalisador no custo total de produção. Neste sentido, pode ser razoável a escolha de um biocatalisador de baixa capacidade de reuso contanto que este tenha um baixo custo; em reações curtas, é esperado que o biocatalisador possa ser reutilizado por um número elevado de ciclos de reação, para evitar frequentes recarregamentos/substituição deste no processo.

A meta de contribuição do custo do biocatalisador no produto é de 5%, de acordo com o sugerido no trabalho de Tufvesson et al. (2011) (Tufvesson *et al.*, 2011a). Para especialidades químicas com valor médio de 5 USD kg⁻¹, temos que o biocatalisador deve equivaler a 0,25 USD kg⁻¹ produto. Assim, para identificar esta contribuição de custo do biocatalisador é necessário multiplicar a produtividade catalítica em ciclo único pelo número de reusos sequenciais, multiplicar o resultado pelo valor de venda do produto e comparar percentualmente com o custo de 1 kg de biocatalisador, conforme mostrado na Eq. 12.

$$\text{Eq.12} \quad \text{Contribuição \% do biocat} = \frac{(\text{Custo biocat. kg} \times 100)}{(\text{Prod. Catalítica} \times N^{\circ} \text{ reusos} \times \text{Valor de venda kg prod})}$$

Para ilustrar a insuficiência do número de reusos sequenciais (3) observados no sistema multicompetitivo 1:1 em frasco agitado com a Novozym 435 (1,3% m/m de carga de biocatalisador), tem-se que a produtividade catalítica é de 219,9 kg produto kg⁻¹ de biocatalisador, que multiplicado pelo valor de venda médio de especialidades químicas chega à 1099,5 USD auferidos com o que foi produzido com 1 kg de biocatalisador. Este valor de receita de produto produzido com 1 kg de biocatalisador é apenas ligeiramente superior ao valor do custo de 1 kg de Novozym 435 (924 USD kg⁻¹), o que mostra a inviabilidade econômica do processo, já que o biocatalisador é apenas um dos insumos da produção. Para limitarmos a contribuição do catalisador a 5% do valor de venda por kg, seria necessário um grande aumento da produtividade catalítica, passando de 219,9 kg produto kg⁻¹ de biocatalisador para 3627,9 kg produto kg⁻¹ de biocatalisador, com pelo menos 50 reusos sequenciais sem perda de atividade, ou seja, um aumento de 16,4 vezes na produtividade catalítica.

Um aspecto pouco discutido nos estudos de reuso de biocatalisadores é a relação entre o tempo de reação e a carga de biocatalisador, parâmetros proporcionalmente

relacionados. Como já mencionado anteriormente, os estudos de reuso são feitos baseados na condição considerada ótima para o processo, sem que se verifique diretamente a influência dos parâmetros reacionais na reuso, mas como uma resultante das condições de processo como um todo. Outro aspecto negligenciado é a relação entre o tempo de reação e o meio reacional – se temos um biocatalisador trabalhando continuamente sob agitação intensa, temperatura, presença de potencial inibidores e/ou compostos que podem afetar o suporte de imobilização do biocatalisador, é intuitivo pensar que reações longas resultarão em baixo desempenho de reusabilidade do biocatalisador. Por outro lado, o inverso também pode ser dito – reações curtas podem potencialmente favorecer a capacidade de reuso.

Os estudos no protótipo de reator de coluna de bolhas indicaram 13 reusos com reações de 3 h de duração (Figura 19), o que representa um incremento de 4,3 vezes na capacidade de reuso em relação ao obtido em frasco agitado. A mesma marca, 13 reusos, foi alcançada com 2 h de reação. O resultado obtido, contrariamente ao esperado, pode ter relação com a ausência de etapas de lavagem do biocatalisador e o acúmulo de reagentes não reagidos no suporte de imobilização. Ainda que o número de reusos seja inferior ao necessário para atingir a meta estabelecida de contribuição do custo do biocatalisador no custo médio das especialidades químicas produzidas (5%), é preciso levar em conta que este resultado foi obtido com um protótipo ainda bastante simples de reator de coluna de bolhas, cujo dispositivo de borbulhamento (vidro sinterizado) pode ser amplamente aprimorado ou substituído por borbulhadores que: i) minimizem o entupimento dos poros; ii) uniformizem o formato das bolhas; iii) reduzam o tamanho das bolhas, diminuindo o impacto dos choques destas no biocatalisador e favoreçam a transferência de massa. Um reator de coluna de bolhas com desenho mais aprimorado e equipamento com dispositivos de monitoramento contínuo da reação poderia levar este resultado mais próximo ao alcance da meta de 50 reusos. A quantidade de reusos sequenciais (13) obtida no reator de coluna de bolhas para a reação em sistema multicompetitivo, contudo, é suficiente para atingir a meta de produtividade catalítica pretendida – 878,5 kg produto kg^{-1} biocatalisador, acima do mínimo preconizado no trabalho de Tufvesson et al. (2011), de 400 kg de produto por kg de biocatalisador (Tufvesson *et al.*, 2011a), enquanto no frasco agitado, com apenas 3 reusos sequenciais, esta marca não é atingida.

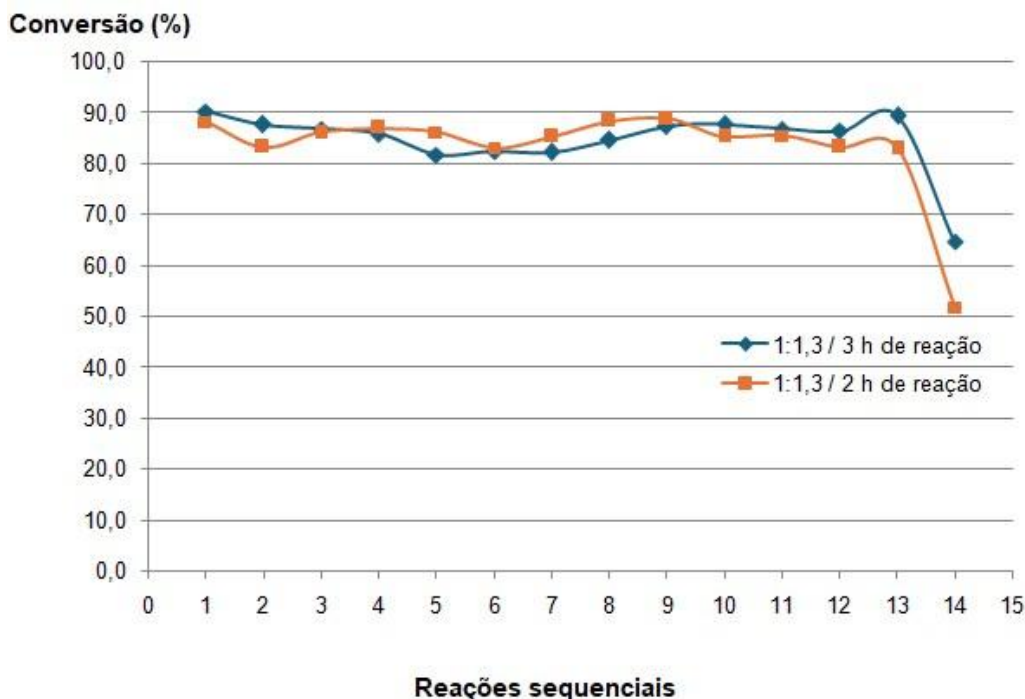


Figura 19. Variação da conversão dos ácidos à ésteres em reações sequenciais, para estudo de reuso da Novozym 435 na reação em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oléico com etanol e *n*-octanol conduzida em protótipo de reator de coluna de bolhas. Condição reacional: carga de biocatalisador 1,3% m/m, 50 °C, razão molar ácidos:álcoois 1:1,3, em ciclos de 3 h e 2 h de reação.

6.5. Vantagens e desvantagens do sistema multicompetitivo para produção biocatalítica de ésteres

O questionamento mais imediato sobre os sistemas multicompetitivos diz respeito ao fato de que os produtos saem misturados do reator. Separações de misturas podem vir a ser complexas e custosas, tanto em nível laboratorial quanto em nível industrial. Outro questionamento, em decorrência do primeiro, envolve as concentrações dos produtos pós-reação: por serem vários produtos misturados no meio ao término da reação, a concentração de um produto individualmente, em sistema multicompetitivo, será menor do que a concentração deste mesmo produto em uma reação individual sem solvente. A resposta para essas duas questões está apoiada na premissa de que o sistema multicompetitivo mostra-se mais atrativo para os casos que envolvem as sínteses de ésteres de cadeia curta. Como estas frequentemente demandam solventes para sua viabilização, o sistema multicompetitivo é uma forma de dispensar a utilização de solventes, conjugando a síntese do éster de cadeia curta com a síntese de outros ésteres. Desta forma, melhora-se a produtividade volumétrica do reator. Somado a isso, este trabalho apontou indícios de que meios reacionais com altas

concentrações de reagentes de cadeia curta tendem a desfavorecer o reuso das lipases imobilizadas. Logo, os sistemas multicompetitivos ao atenuarem estas concentrações, tendem a favorecer o reuso das lipases imobilizadas, impactando positivamente a produtividade catalítica do processo em relação às reações individuais dos ésteres de cadeia curta (ou de cadeia média/longa que envolvam um reagente de cadeia curta).

Um sistema multicompetitivo contendo apenas ésteres de cadeia média ou longa não parece ser tão interessante já que estas sínteses, individualmente, podem atingir altas conversões em meio sem solvente. Contudo, mesmo a síntese de ésteres de cadeia média ou longa pode vir a envolver algum reagente de cadeia curta com intenso efeito inibitório, como o etanol, exemplo aqui estudado. O sistema multicompetitivo, nesse sentido, pode viabilizar a utilização de algum biocatalisador de baixa tolerância a um ácido ou álcool de cadeia curta, evitando o uso de solventes, cujas implicações levam à métricas de processos inviáveis, conforme previamente discutido.

A respeito da separação dos ésteres obtidos em sistema multicompetitivo, também já anteriormente mencionada, o caso estudado nesta tese é propositalmente complexo para robustecer a prova de conceito e o estudo preliminar de viabilidade técnico-econômica. Mas um sistema multicompetitivo não necessariamente precisa envolver tantos componentes simultaneamente, podendo ser um sistema formado a partir da mistura de dois ácidos e um álcool, um ácido e dois álcoois, dois ácidos e dois álcoois, etc. O estabelecimento destas misturas pode, além da hidrofobicidade inicial, prever combinações que facilitem a separação dos produtos, como por exemplo a utilização de misturas com grande variação de tamanho de cadeia entre os diferentes ácidos/álcoois. Além disso, os sistemas multicompetitivos podem ser estabelecidos de forma a gerar misturas que não demandem a separação completa de todos os componentes da mistura gerada, o que pode ser vislumbrado no caso dos ésteres cosméticos, em cujas formulações são demandados ésteres de diferentes tamanhos de cadeia (fragrâncias – ésteres de cadeia curta, e emolientes/umectantes – ésteres de cadeia média e longa). Para exemplificar o exposto acima, estudou-se um sistema multicompetitivo formado pela mistura de ácido acético (C2) e ácido palmítico (C16) reagindo com etanol (C2). Neste caso, a combinação dos dois ácidos com um álcool pode gerar apenas dois ésteres – acetato de etila e palmitato de etila. A reação foi estudada na condição 1:1 em frasco agitado à 60 °C (por conta do ponto de fusão do ácido palmítico, 61 °C), com batelada alimentada de ácido acético. Após 3 h de reação, a conversão do ácido palmítico foi de 90,1%; neste meio reacional foi adicionado ácido acético, cuja conversão em mais 2 h de reação foi de 45,0%,

com carga de biocatalisador 1,3% m/m Novozym 435. Este sistema multicompetitivo é relativamente hidrofílico (logP 1,6) com concentrações altas de ácido acético e etanol (respectivamente 126,6 e 194,2 g L⁻¹ em condição equimolar). Os ésteres formados tem grande diferença de ponto de ebulição (77 °C e 303 °C). As análises do meio reacional em CG revelaram concentrações de 50,6 g L⁻¹ de acetato de etila e 673,7 g L⁻¹ de palmitato de etila. A concentração de acetato de etila obtida é superior às reportadas por estudos que tentam obter acetato de etila de origem biológica (por via fermentativa), cujas concentrações são inferiores a 20 g L⁻¹ (Bohnenkamp *et al.*, 2020; Jankovi, Straathof e Kiss, 2025; Zhang *et al.*, 2020). O ácido acético não-reagido, o etanol não-reagido e o acetato de etila formado podem ser removidos por extração com água em contracorrente, e depois separados por destilação azeotrópica; já o ácido palmítico e o palmitato de etila podem ser separados diretamente por destilação à vácuo, considerando a diferença de ponto de ebulição (ácido palmítico: 351 °C e palmitato de etila: 303 °C). Ressalta-se que as condições reacionais dessa síntese em sistema multicompetitivo podem ser exploradas mais profundamente para otimizar o resultado de conversão e as métricas de processo. As concentrações menores de cada éster obtidas em sistema multicompetitivo de fato representam uma desvantagem em relação às reações individuais. Mas o sistema multicompetitivo pode ser atrativo para plantas multipropósito que produzem uma variedade grande de diferentes ésteres como especialidades químicas, com menores volumes de produção individual para cada éster. Este pode vir a ser o caso de indústrias que produzem ésteres como realçadores de sabores, aromas e fragrâncias, com vasto portfólio de produtos.

Se avaliado sob a perspectiva de formação de cada éster individualmente, os sistemas multicompetitivos podem gerar concentrações destes ésteres isoladamente similares às obtidas em reações com solventes. Contudo, deve se avaliar sob a ótica do processo como um todo, que ao invés de demandar a separação e o reciclo de um solvente misturado ao produto (custo), requer a separação produto-produto (receitas).

É possível argumentar que a separação e o reciclo de solventes sejam operações de baixa complexidade e de custo menor do que separações entre diversos produtos; contudo, há situações em que solventes bastante difundidos nas sínteses enzimática de ésteres, como o *n*-hexano, o cicloexano ou o tolueno, tem pontos de ebulição próximo a ésteres de cadeia curta como o formato de etila, formato de propila, acetato de etila ou acetato de *n*-propila, o que torna a separação entre estes ésteres e estes solventes bem mais desafiadora. Como já exposto, a utilização de solventes acarreta uma série de problemas, mas no caso da rota biocatalítica torna-se difícil defender um processo supostamente “verde” que se vale de solventes tóxicos, inflamáveis e de origem fóssil.

6.6 Modelagem, simulação do processo e avaliação preliminar da viabilidade técnico-econômica

6.6.1 Premissas de escalonamento e modelagem do processo

Atualmente, alguns sites na internet atuam como *marketplaces* de produtos químicos em grandes quantidades, nos quais é possível encontrar os custos de certas matérias-primas. A disponibilidade desses dados contribui com a redução das incertezas na definição das premissas econômicas, já que são dados comerciais correntes em valores atualizados. Contudo, dados de especialidades químicas e de compostos de menor volume de produção não são encontrados com facilidade. Sendo assim, é necessário lançar mão de dados de custo destes reagentes em escala laboratorial. O trabalho de Tufvesson et al. (2011) sugere utilizar um fator de divisão, de 10 a 30, para fazer equivalência entre dados de custo em escala laboratorial e industrial (Tufvesson *et al.*, 2011a). O levantamento realizado para esta tese contemplou tanto informações sobre custos e valor de venda em quantidades industriais quanto laboratoriais, conforme mostrado na Tabela 12. Na Tabela 12 pode-se observar que o valor de venda da maioria dos ésteres aqui obtidos é superior ao valor médio de 5 USD kg⁻¹ mencionado no estudo de Tufvesson e co-autores (2011) (Tufvesson *et al.*, 2011a), com exceção do acetato de etila, que tem valor de venda médio de 3,5 USD kg⁻¹.

Com relação à escala de produção para o estudo, a premissa adotada para definição da escala baseou-se em informações sobre a capacidade de produção de plantas industriais de ésteres, ou de compostos relacionados à aromas e realçadores de sabores (*flavor esters*). A partir das informações obtidas, foi definida a escala inicial de estudo na modelagem,

considerando que a planta modelada para produção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo representaria uma fração das plantas de maior tamanho, por exemplo, entre 15 e 20% da capacidade da maior planta. A motivação para estudar plantas de média ou pequena escala é robustecer a análise preliminar de viabilidade técnico-econômica, já que um indicativo de viabilidade em pequenas escalas certamente resulta em viabilidade em escalas maiores, devido ao efeito de economia de escala. Neste sentido, a Tabela 20 compila as informações coletadas. A partir destes dados, então, definiu-se como escala inicial de estudo uma planta com capacidade para produção média de 6000 ton métricas de ésteres ao ano.

Tabela 20: Capacidade de produção de plantas industriais de ésteres

| Planta industrial | Capacidade |
|--|-------------------|
| Produção de ésteres emulsificantes no Japão – Mitsubishi Chemicals ^[1] | 2000 ton/ano |
| Planta de produção de resinas poliéster na China - BASF ^[2] | 18800 ton/ano |
| Planta de produção de <i>flavor esters</i> na Índia – IFF Inc. ^[3] | 36000 ton/ano |
| Planta de produção de acetato de vinila na Índia – Dow Chemicals ^[4] | 40000 ton/ano |

^[1] https://www.mcgc.com/english/news_release/01877.html

^[2] <https://www.basf.com/global/en/media/news-releases/2025/03/p-25-058>

^[3] <https://sricity.in/en/events/iff-breaks-ground-for-flavorsfragnances-site-in-sri-city/>

^[4] <https://environmentclearance.nic.in/ABC/DOW/PFR/VER2.0>

O modelo de processo para obtenção biocatalítica de ésteres em sistema multicompetitivo foi desenhado para operação contínua, com 7920 horas de operação por ano, prevendo a obtenção dos 6 ésteres – acetato de etila, acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila – separadamente para comercialização.

O processo inclui operações básicas de mistura e transporte dos reagentes até o reator (*upstream*), a reação em reator de coluna de bolhas com a remoção da água formada na reação e as operações de separação (*downstream*). O reator de coluna de bolhas foi alimentado com ar comprimido seco na base, para formação das bolhas e promoção da agitação do meio

reacional, sendo lançado na atmosfera como ar úmido após a passagem pelo reator. As seções de *upstream* e reação estão mostradas na Figura 20.

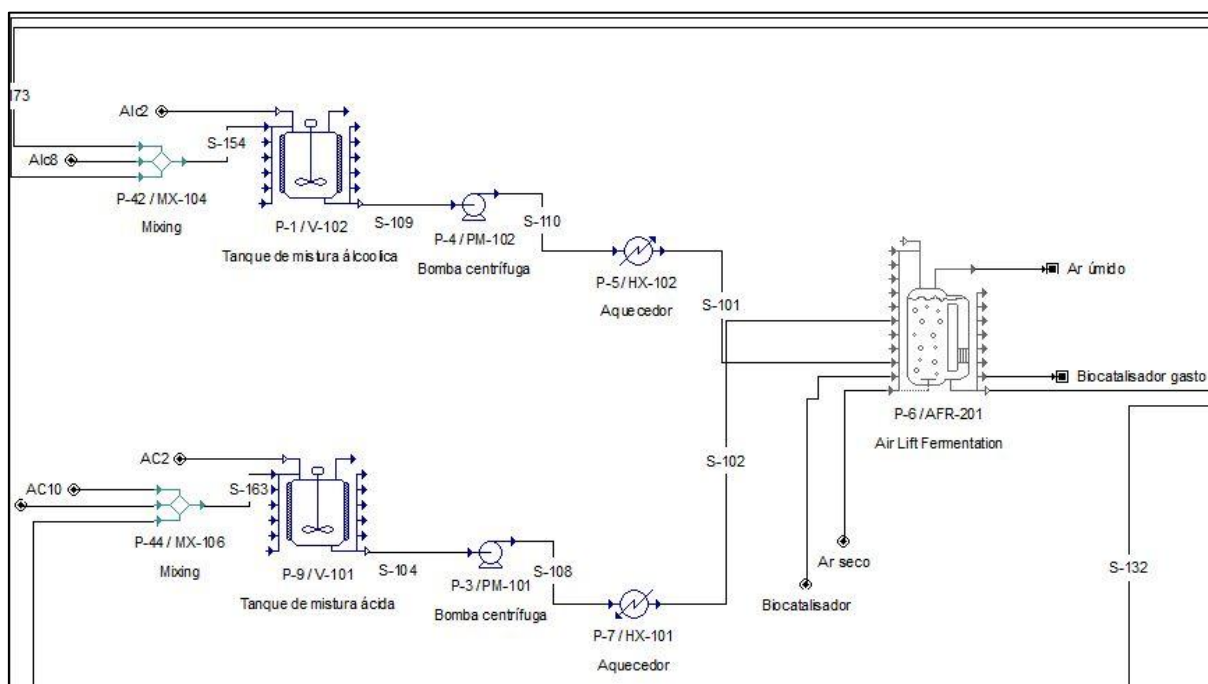


Figura 20: Seções de *upstream* e reação na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13.

Após a reação, o meio reacional é bombeado até a primeira etapa de separação. Considerando as recomendações de Towler e co-autores (2013), as operações de separação priorizam inicialmente os compostos mais leves e de menor custo (Towler e Sinnott, 2013). No caso estudado, os compostos mais leves são também os de menor custo, a saber, etanol, ácido acético e acetato de etila, conforme dados das Tabela 4, 5 e 12. Neste sentido, adotou-se uma coluna de *stripping* (absorção por arraste em contracorrente, C-301) para remover ácido acético, etanol e acetato de etila (compostos mais hidrofílicos do meio reacional) com vapor de água. Esta operação unitária é geralmente adotada para remover compostos voláteis de meios fermentativos por arraste com N₂ ou CO₂ (Jin *et al.*, 2011; Qureshi, 2014). As colunas de *stripping* também são adotadas em etapas de desodorização de óleos vegetais (remoção de ácidos graxos livres por vapor pressurizado) (Usseglio, Salvadori e Siri, 2019). Na base da coluna injeta-se uma corrente de vapor de alta pressão (S-132), que sobe ao longo da coluna em contracorrente com o meio reacional, absorvendo os compostos hidrofílicos, que são removidos no topo da coluna (S-106). A corrente de topo (S-106) é uma mistura de água, ácido acético, etanol e acetato de etila, cujos componentes são separados por uma sequência

de colunas de destilação (C-302, C-303 e C-304). A mistura azeotrópica etanol-acetato de etila é separada segundo a metodologia de destilação por troca de pressão (Shuhan *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2017), nas quais se obtém o acetato de etila em pureza de 99%. As correntes S-164 e S-167 são compostas por água, etanol e ácido acético não-convertidos, consideradas como água residual para tratamento. No fundo da coluna de *stripping*, retira-se o meio reacional remanescente (S-107), conforme mostrado na Figura 21.

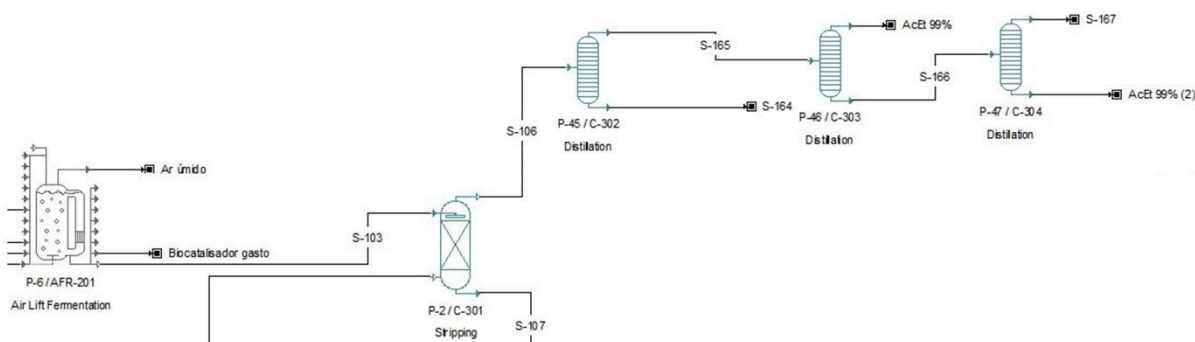


Figura 21: Seção de *downstream* para remoção dos componentes leves e separação do acetato de etila na modelagem da produção obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13.

O meio reacional remanescente, que sai do fundo da coluna de *stripping* (S-107) é submetido à uma sequência de separações usando evaporadores *flash* sob vácuo (V-301, V-302, V-303) e destilações a vácuo (C-305, C-306, C-307). O primeiro estágio da evaporação *flash* à vácuo gera uma corrente de fundo (S-112) com oleato de octila (17,9% em fração mássica) e caprato de octila (14,3% em fração mássica) no fundo e outra corrente com acetato de octila (33,3% em fração mássica) e caprato de etila (29,5%) no topo (S-111), além dos reagentes não-convertidos e *n*-octanol em excesso. Esta corrente de topo (S-111) passa por um segundo estágio de destilação *flash*, sendo enriquecida em acetato de octila (49,2% em fração mássica), que depois em uma coluna de destilação a vácuo (C-306) chega a 99% de pureza de acetato de octila no topo. A corrente de fundo da coluna de destilação a vácuo (C-306) possui 72,7% em fração mássica de caprato de etila que, em um segundo estágio de destilação a vácuo (C-307) é separado no topo com 99% de pureza, saindo uma corrente de fundo (S-158) rica em ácido cáprico que é reciclado para o tanque de mistura ácida (V-101). A corrente de fundo (S-112) do primeiro evaporador *flash* (V-301) tem alta concentração de *n*-octanol (23,1%) além dos ésteres de cadeia média e longa acima citados; esta corrente passa por uma sequência de evaporadores e colunas de destilação (C-305, V-303, C-308, V-304 e

C-309) para recuperar parte do *n*-octanol e retorná-lo ao tanque de mistura alcoólica (V-102). A corrente de fundo da C-305 (S-105) é uma mistura rica em oleato de octila e ácido oleico, sendo resfriada por meio de um trocador de calor do tipo casco-tubo e encaminhada para separação. As correntes de fundo (S-125, S-136) dos evaporadores *flash* citados são novamente misturadas, também resfriadas em trocadores de calor e encaminhadas para separação, assim como a corrente de fundo (S-128) da coluna de destilação C-308. Estas correntes saem em temperaturas altas (entre 117 e 183 °C) e trocam calor com o vapor que alimenta (S-132) a coluna de *stripping*, reduzindo a demanda energética da planta. A representação gráfica da modelagem destas etapas de separação é apresentada na Figura 22.

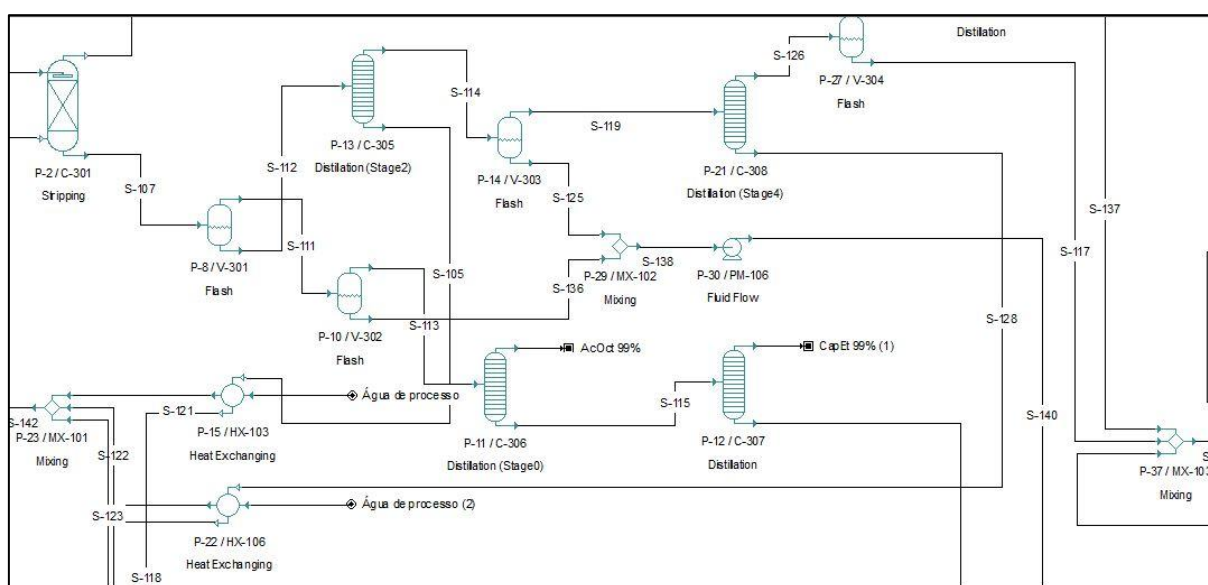


Figura 22: Seção de *downstream* para remoção dos componentes de cadeia média e separação do acetato de octila e caprato de etila na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13.

As correntes de fundo dos evaporadores *flash* V-302 e V-303 que foram novamente misturadas tem 36,2% de caprato de octila, 25,1% de oleato de etila, 6,0% de caprato de etila e reagentes não-reagidos (16,2% de ácido cáprico e 12,0% de ácido oléico). Como estes ácidos e o caprato de octila tem pontos de fusão iguais ou maiores que 0 °C, esta corrente e a mistura oleato de octila/ácido oléico (S-128), seguem para uma sequência de etapas de resfriamento e centrifugação a frio com centrífugas do tipo cesta – BC-301, BC-302, BC-303, BC-304 e BC-305) (Eyskens *et al.*, 2020). Nestas etapas, obtém-se oleato de octila, oleato de etila (parcial) e caprato de octila com 99% de pureza (Figura 23), bem como ácidos cáprico e oleico para realimentar o tanque de mistura ácida (V-101).

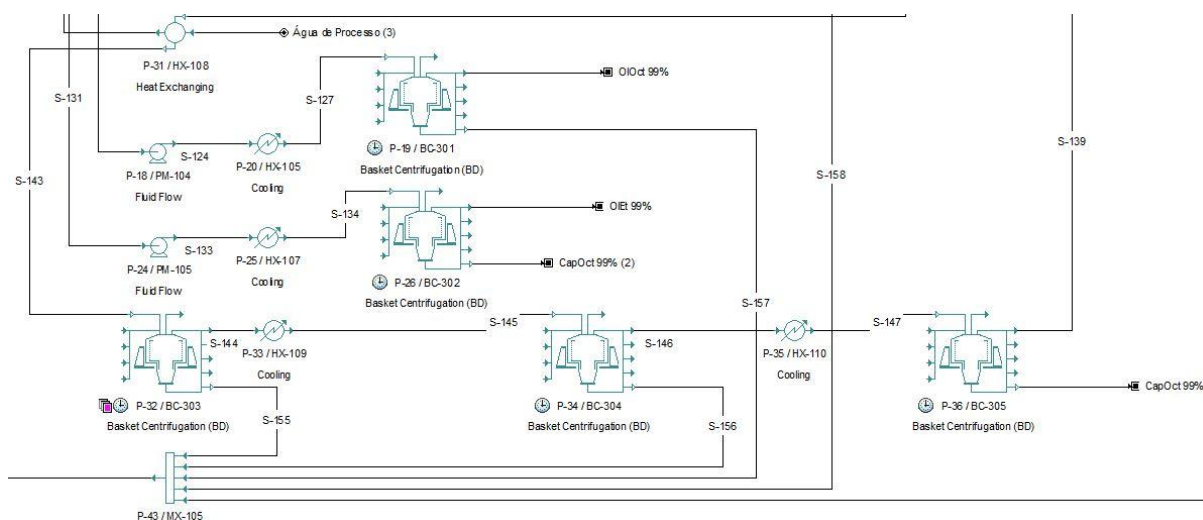


Figura 23: Seção de *downstream* para remoção dos componentes de cadeia média/longa e separação do oleato de etila, caprato de octila e oleato de octila na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13.

A corrente de saída do BC-305 (S-139) é misturada com as correntes de fundo do evaporador *flash* V-304 (S-117) e a coluna de destilação C-309 (S-137), resultando em uma mistura de oleato de etila (29,0%), *n*-octanol (28,8%), ácido cáprico (22,8%), caprato de etila (14,6%) e acetato de octila (4,6%). Esta corrente é resfriada e centrifugada para separar o ácido cáprico e retorná-lo ao tanque de mistura ácida. A corrente remanescente da centrifugação a frio é passa por mais uma bateria de colunas de destilação (C-310, C-311, C-312 e C-313), nas quais se como corrente de fundo destas colunas as concentrações remanescentes de oleato de etila, de caprato de etila e de acetato de octila, conforme mostrado na Figura 24. A corrente de fundo da C-312 (S-171) e a corrente de topo da C-313 (S-169) são ricas em *n*-octanol e são recicladas ao tanque de mistura alcoólica (V-102).

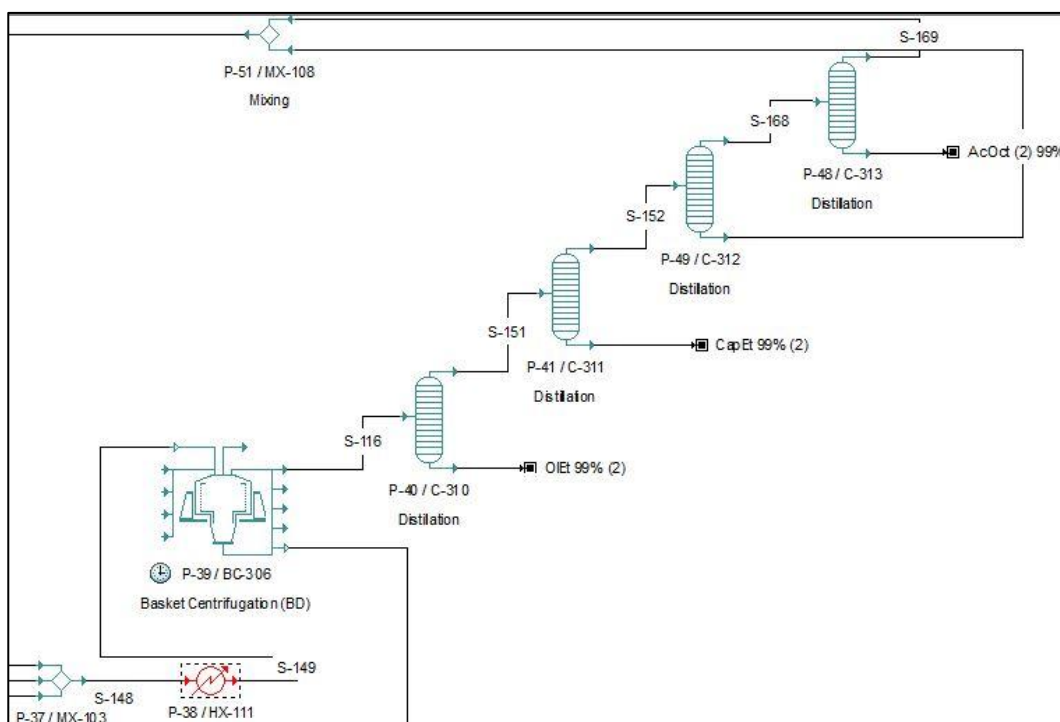


Figura 24: Seção de *downstream* para remoção dos componentes de cadeia curta/média/longa e separação das concentrações remanescentes de acetato de octila, caprato de etila e oleato de etila na modelagem da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol utilizando o software SuperPro Designer v13.

Ressalta-se que o sistema multicompetitivo aqui estudado constitui-se como um exemplo complexo e desafiador para a modelagem e simulação de um processo, dado que ao término da reação tem-se 11 componentes distintos (os 6 produtos formados + 5 reagentes não-convertidos em menor concentração), dos quais forma-se pelo menos uma mistura azeotrópica bastante conhecida (etanol-acetato de etila). Este modelo de maior complexidade foi definido para tornar mais robusta a prova de conceito do sistema multicompetitivo como estratégia técnico-economicamente viável para obtenção de ésteres de diferentes tamanhos de cadeia. Todavia, é importante novamente ressaltar que sistemas multicompetitivos muito mais simples que o inicialmente proposto podem ser adotados, como o exemplo estudado do sistema AC2-AC16-Alc2, no qual se forme apenas acetato de etila e palmitato de etila (sistema com 3 reagentes e 2 produtos, além da água formada).

6.6.2 Simulação de processos, avaliação preliminar da viabilidade econômica e identificação de gargalos operacionais

Após definido o modelo de processo para obtenção de 6000 ton/ano de ésteres (cenário base) por meio de reação em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol em modo contínuo, estudou-se a avaliação preliminar da viabilidade técnico-econômica a partir da estimativa de receitas, CAPEX e OPEX.

Considerando a utilização de Novozym 435 como biocatalisador em um reator de coluna de bolhas e uma seção de *downstream* contendo um número elevado de etapas de separação, a análise econômica revelou um CAPEX estimado de USD 30,5 milhões para construção da planta e um OPEX estimado de USD 37,5 milhões anuais para sua operação, conforme mostrado na Tabela 23. As receitas anuais foram estimadas em USD 61,7 milhões, superando em USD 24,2 milhões anuais os custos operacionais, considerando a separação dos 6 ésteres formados e sua venda com os valores apresentados na Tabela 12. O balanço entre receitas anuais e custos operacionais é positivo, resultando em um cálculo de NPV de USD 90,5 milhões de dólares ao longo de 15 anos de operação da planta industrial. Para cobrir o CAPEX investido neste panorama de receitas são necessários 1,8 anos (*payback time*), dentro do padrão usualmente adotado para investimentos na indústria química (Turton *et al.*, 2018). As Tabelas 21 e 22 compilam as informações avaliadas no cenário-base. Ainda que estudos como estes tenham elevado grau de incerteza e estejam apoiados em estimativas de custo de aquisição e instalação de equipamentos, é possível verificar a potencial viabilidade técnico-econômica preliminar deste processo com base nas premissas adotadas.

Tabela 21: Balanços de massa e energia da modelagem e simulação da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol, em produção contínua (7920 h de operação ano⁻¹) e capacidade média de produção de 6000 ton ano⁻¹

| Item | Valor/ano |
|-------------------|---------------------|
| Ácido acético | 951,2 ton métricas |
| Ácido cáprico | 1601,1 ton métricas |
| Ácido oléico | 2196,5 ton métricas |
| Etanol | 1422,9 ton métricas |
| <i>n</i> -Octanol | 1791,2 ton métricas |

| | |
|--|-----------------------|
| Novozym 435 | 5,4 ton métricas |
| Água de processo | 8782,2 m ³ |
| Ar comprimido | 1200000 kg |
| Vapor (média pressão) | 788 ton métricas |
| Vapor (alta pressão) | 21888 ton métricas |
| Energia elétrica | 122 MWh |
| Salmoura para resfriamento | 535 ton métricas |
| Acetato de etila | 175,0 ton métricas |
| Acetato de octila | 659,2 ton métricas |
| Caprato de etila | 754,5 ton métricas |
| Caprato de octila | 1597,5 ton métricas |
| Oleato de etila | 1026,9 ton métricas |
| Oleato de octila | 1738,0 ton métricas |
| Resíduos (água, ácido acético, etanol, biocatalisador gasto) | 9527,7 ton métricas |

Tabela 22: Parâmetros econômicos de avaliação preliminar de viabilidade técnico-econômica da obtenção de ésteres por via biocatalítica em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico e oleico com etanol e *n*-octanol, em produção contínua (7920 h de operação ano⁻¹) e capacidade média de produção de 6000 ton ano⁻¹

| Indicador | Valor |
|---|-------------|
| CAPEX total | USD 30,5 mi |
| OPEX total (anual) | USD 37,5 mi |
| NPV | USD 90,5 mi |
| Tempo de retorno do investimento (<i>payback</i>) | 1,8 anos |
| IAV | 2,85 |
| Margem bruta | 39,2% |
| Retorno do investimento | 55,8% |
| Taxa interna de retorno (após taxas) | 39,9% |
| Lucro bruto (anual) | USD 24,2 mi |
| Taxas (40%) | USD 9,6 mi |
| Lucro líquido (anual) | USD 17,0 mi |

Uma avaliação mais detalhada dos custos operacionais revela que os custos de matéria-prima contribuem com 70,6% do total dos custos operacionais, já que são

consumidos reagentes em grandes quantidades e estes tem considerável custo de aquisição (Tabela 12). A utilização de várias matérias-primas no processo pode ser um fator de risco e incerteza para a viabilidade técnico-econômica do processo, já que flutuações no custo das matérias-primas podem gerar indicadores econômicos negativos. Contudo, considerando-se um cenário de aumento de 30% no custo médio de cada um dos 3 ácidos e dos 2 álcoois utilizados, mantendo fixa a escala de produção, tem-se que o NPV ainda é positivo (passando de USD 90,5 milhões para USD 59,3 milhões) e o tempo de retorno de investimento ainda situa-se em patamar aceitável (passando de 1,8 anos para 2,4 anos).

Neste panorama de custos elevados de matérias-primas, o reciclo dos reagentes não-reagidos mostrou-se crucial para a viabilidade econômica do processo. O reciclo dos reagentes não demandou etapas adicionais no processo (o que significaria maior CAPEX), já que os equipamentos destinados a recuperar os reagentes não-reagidos também são necessários na separação dos produtos, como é o caso das colunas C-307, C-309, C-312 e C-313 e das centrífugas BC-301, BC-303, BC-304 e BC-306.

Do total do CAPEX do processo, 90,4% deste – USD 27,6 milhões – está alocado na seção de *downstream* do processo, evidenciando o quanto a separação dos 6 ésteres estudados é complexa. A complexidade da separação dos ésteres também se reflete na elevada contribuição dos custos operacionais referentes ao processo, descritos no SuperPro Designer como “*facility-dependent costs*” no CAPEX total (13,4%) e no elevado consumo de vapor de alta de pressão e de água nas operações de separação (Tabela 22). Todavia, as utilidades representaram apenas 1,5% do OPEX total, devido à integração energética entre correntes frias e quentes de maior vazão no processo simulado. A alegada vantagem da redução do consumo de energia em processos biocatalíticos só se observa na seção de reação, já que a seção de *downstream* no caso estudado é intensiva em energia. Ainda que muitas etapas de separação tenham sido necessárias, o processo modelado desconsiderou a formação de produtos de reações paralelas, já que a possibilidades destas em sínteses enzimáticas é remota. Isto dispensa etapas de purificação (tais como desodorização e branqueamento) no processo, conforme discutido por Ansorge-Schumacher & Thum (2013) (Ansorge-Schumacher e Thum, 2013). Como já afirmado anteriormente, o caso estudado é propositalmente complexo por envolver a obtenção e a separação de 6 ésteres. Assim, se neste caso complexo, modelado em uma escala de produção relativamente pequena, já se obtém indicadores econômicos positivos que apontam para uma viabilidade preliminar, a tendência é que em sistemas mais simples

(com menor número de componentes) e/ou em maior escala de produção também se atinja a viabilidade econômica.

O custo do biocatalisador, frequentemente apontado como um dos grandes gargalos dos processos biocatalíticos, neste caso teve contribuição em torno de 18,7% do custo das matérias-primas e 13,2% do OPEX total. Esta contribuição do custo do biocatalisador nos custos operacionais totais é relativamente baixa, considerando a grande diferença de custos por kg do biocatalisador (924 USD kg⁻¹) em relação às matérias-primas (inferiores a 5 USD kg⁻¹) e produtos acabados (inferiores a 20 USD kg⁻¹). Isso se dá particularmente pela baixa carga de biocatalisador estudada (1,3% m/m total dos substratos) conciliada com o atingimento de altas conversões (> 80%) em tempo curto de reação (2 h), e a considerável capacidade de reuso alcançada com o reator de coluna de bolhas (13 ciclos de 2 h, 26 h de operação). A conjunção destes fatores resulta em alta produtividade catalítica, reduzindo o impacto do custo do biocatalisador nos custos operacionais totais. Tendo em vista o valor de venda médio dos ésteres obtidos – 9,1 USD kg⁻¹ – a contribuição do custo da Novozym 435 no valor de venda dos produtos na reação em sistema multicompetitivo foi de 11,5%, conforme detalhado na Equação 13. O valor obtido é superior ao preconizado no estudo de Tufvesson e co-autores (2011) (Tufvesson *et al.*, 2011a) – 5% – mas mesmo nesta condição é possível alcançar indicadores econômicos positivos no caso-base estudado.

$$\text{Eq. 13} \quad \text{Contribuição \% do biocat} = \frac{(924 \text{ USD/kg} \times 100)}{(67,6 \text{ kg/kg} \times 13 \times 9,1 \text{ USD/kg})} = 11,5\%$$

A elevada produtividade volumétrica do processo resulta em um reator de volume relativamente pequeno (5 m³) e custo baixo (estimativa de 65 mil dólares para reator construído em aço inox SS316). A seção de reação contribui com apenas 6,2% do total do CAPEX e com 14,1% do OPEX. A água removida da reação pode ser reaproveitada como água de resfriamento no processo, reduzindo a elevada pegada hídrica do processo (8782,2 m³ de água por ano, equivalente ao consumo diário de uma cidade de 50000 habitantes) e trazendo mais um importante atributo de sustentabilidade ao processo.

Ao analisar detalhadamente as receitas auferidas no processo é possível avaliar o impacto da presença dos reagentes de cadeia longa (oleato de etila e oleato de octila) no processo como um todo. Devido à massa molecular elevada, a quantidade mássica destes

ésteres produzida na planta é superior à dos ésteres de cadeia curta e média (Tabela 22). Somado a isso, o oleato de octila é o éster de maior valor de venda dentre os 6 ésteres produzidos (16,4 USD kg⁻¹), conforme os dados levantados e apresentados na Tabela 12, gerando uma receita de USD 28,6 milhões ao ano (46,3% do total das receitas). Ao simular um cálculo econômico com o oleato de octila sendo comercializado por metade do valor aqui utilizado (8,2 USD kg⁻¹), observa-se grande impacto nos indicadores econômicos – ainda que o balanço entre receitas e custos operacionais por ano seja ligeiramente positivo, o NPV fica negativo em USD 1.71 milhões. Por outro lado, o éster de cadeia mais curta estudado, o acetato de etila, tem o menor valor de venda dentre os 6 ésteres produzidos (3,5 USD kg⁻¹) e é o éster produzido em menor quantidade na planta (174 ton métricas ano⁻¹). Isto pode representar um outro aspecto interessante dos sistemas multicompetitivos: a síntese de ésteres de cadeia longa favorece (tecnicamente) a síntese dos ésteres de cadeia curta em meios sem solvente, mas também pode favorecer economicamente a obtenção dos ésteres de cadeia curta por biocatálise, que por si só, tendem a ser inviáveis. Os dados de produção mássica e valor de venda podem auxiliar na definição de sistemas multicompetitivos de produção de ésteres que atinjam viabilidade técnico-econômica.

7 CONCLUSÕES

Neste trabalho demonstrou-se que é possível obter ésteres de diferentes tamanhos de cadeia simultaneamente – reação em sistema multicompetitivo – em uma única etapa e sem solventes, utilizando lipases imobilizadas comerciais. Ao comparar o desempenho de reações de esterificação em sistema multicompetitivo dos ácidos acético, cáprico, oleico com etanol e *n*-octanol com as reações individuais de cada um destes ácidos com cada um destes álcoois, pudemos atingir em sistema multicompetitivo conversões iguais ou superiores às atingidas individualmente nas reações com a lipase imobilizada comercial Novozym 435. Baixas conversões em reação individual foram obtidas para a síntese de ésteres de cadeia curta – 17,7% na síntese do acetato de etila em razão molar 1:1, 4 h de reação, e 51,0% na síntese do acetato de octila em razão molar 1:1, 4 h de reação – e conversões altas para a síntese de ésteres de cadeia média/longa – p.ex: 90,6% na síntese do caprato de octila em razão molar 1:1, 4 h de reação. As reações em sistema multicompetitivo, por outro lado, atingiram conversão total de 88,0% nas mesmas condições reacionais e mesmo intervalo de tempo. Em termos de métricas de processo, a concentração total de ésteres obtidos na reação em sistema multicompetitivo foi de $2,9 \text{ mol L}^{-1}$, enquanto que nas sínteses individuais dos ésteres de cadeia mais curta, as concentrações de produto oscilaram entre 0,4 e $2,4 \text{ mol L}^{-1}$. A produtividade volumétrica da reação em sistema multicompetitivo foi de $0,72 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, ao passo que nestas sínteses individuais do acetato de etila e acetato de octila as produtividades foram inferiores a $0,60 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Considerando o balanço entre conversão e métricas de processo, é possível afirmar que a reação em sistema multicompetitivo é um processo mais eficiente para a obtenção de ésteres de cadeia curta, já que esta é conjugada com a dos ésteres de cadeia média e longa. Os reagentes de cadeia média e longa acarretam efeitos equivalentes aos obtidos com solventes hidrofóbicos no meio – redução da concentração dos ácidos e álcoois de cadeia curta (que possuem notável efeito inibidor sobre as lipases), redução da hidrofiliabilidade geral do meio (que pode ser nociva para a integridade da camada de hidratação das enzimas e sua atividade catalítica) e atenuação da acidez do meio.

Em frasco agitado foi possível observar que a concentração de reagentes de cadeia curta (ácido acético e etanol), bem como a remoção da água do meio reacional, tem influência sobre o reuso da Novozym 435. Com a presença de peneira molecular para remoção da água formada, as sínteses individuais do acetato do octila, do oleato de octila e a reação em sistema

multicompetitivo indicaram igualmente a possibilidade de reutilizar a mesma carga de Novozym 435 (1,3% m/m total) em 3 reações sequenciais. Quando o reuso foi estudado sem a presença de peneira molecular, o meio reacional mais hidrofóbico (síntese do oleato de octila) foi o que favoreceu maior capacidade de reuso do biocatalisador (10 reações sequenciais) enquanto não foi possível reutilizar a Novozym 435 nas reações individuais contendo ácido acético ou *n*-octanol, nem na reação em sistema multicompetitivo.

Quando a reação em sistema multicompetitivo foi estudada em um protótipo de reator de coluna de bolhas, a remoção da água formada no meio reacional foi mais efetiva do que a observada em frasco agitado, levando à necessidade de se adotar ligeiro excesso estequiométrico (1:1,3 ou maior) para atingimento de altas conversões. Por outro lado, foi possível observar um grande ganho em produtividade volumétrica no processo (passando de $0,72 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ para $1,33 \text{ mol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) em relação ao frasco agitado, já que uma conversão de 87,0% dos ácidos à ésteres foi observada em apenas 2 h de reação, e um grande ganho em produtividade catalítica (passando de $209,8 \text{ kg kg}^{-1}$ para $878,8 \text{ kg kg}^{-1}$) foi obtido, devido a possibilidade de reutilizar a mesma carga de Novozym 435 em 13 reações sequenciais.

A condição reacional considerada mais favorável para a reação em sistema multicompetitivo foi a razão molar ácidos:álcoois 1:1,3, carga de biocatalisador 1,3% m/m total, temperatura 50°C , 2 h de reação, em reator de coluna de bolhas. Ao término da reação nesta condição, as análises de cromatografia gasosa indicaram a presença de $26,7 \text{ g L}^{-1}$ de acetato de etila, $82,5 \text{ g L}^{-1}$ de acetato de octila, $94,2 \text{ g L}^{-1}$ de caprato de etila, $197,4 \text{ g L}^{-1}$ de caprato de octila, $128,7 \text{ g L}^{-1}$ de oleato de etila e $217,2 \text{ g L}^{-1}$ de oleato de octila. Esta condição reacional foi utilizada como base para modelar um processo industrial no software SuperPro Designer para obtenção simultânea de acetato de etila, acetato de octila, caprato de etila, caprato de octila, oleato de etila e oleato de octila, em modo contínuo e escala de produção $6000 \text{ ton ano}^{-1}$. A modelagem indicou que, para esta produção, atinge-se um balanço positivo entre custos operacionais e receitas suficiente para retornar o valor investido em menos de 2 anos, com valor presente líquido positivo ao longo do tempo do projeto. Com isto, demonstrase o potencial de viabilizar economicamente a síntese de ésteres por biocatálise com sistemas multicompetitivos.

8 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Dada a complexidade dos sistemas multicompetitivos e tendo como objetivo neste trabalho o desenvolvimento de um processo com potencial viabilidade técnico-econômica, vários aspectos de exploração científica deste objeto de estudo ainda não foram cobertos.

Uma avaliação mais aprofundada da cinética enzimática, englobando a modelagem cinética da reação e a determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten, ajudaria no dimensionamento mais apurado dos reatores para estes processos. A modelagem cinética também poderia também responder se as misturas de ácidos e de álcoois em sistemas multicompetitivos podem afetar a afinidade da lipase pelos substratos em relação às reações com os substratos isoladamente.

Uma avaliação mais aprofundada da termodinâmica do meio reacional em sistema multicompetitivo também poderia auxiliar na compreensão dos efeitos de solvatação e atividades termodinâmicas das espécies químicas do meio, cuja implicação tem relação direta com a conversão dos reagentes em produtos. Um maior entendimento deste tópico ajudaria no estabelecimento assertivo de outras reações em sistema multicompetitivo úteis para aplicações industriais.

Uma avaliação mais aprofundada da dinâmica reacional, utilizando outras técnicas analíticas além das aqui adotadas, lançaria luzes sobre a seletividade das lipases em sistemas multicompetitivos e os efeitos de inibição dos reagentes sobre as lipases imobilizadas.

Um estudo mais apurado da engenharia de reatores e o desenvolvimento de um reator de coluna de bolhas mais sofisticado (com controles de vazão e velocidade de gás, bem como um dispositivo de borbulhamento capaz de produzir bolhas mais uniformes) poderia levar à otimização do processo aqui estudado e de outras reações em sistema multicompetitivo.

Um estudo mais apurado do reuso das lipases imobilizadas em diferentes condições reacionais, verificando a influência dos parâmetros reacionais na capacidade de reuso, pode ajudar na superação de um dos principais gargalos operacionais/econômicos da biocatálise – seu custo elevado – aplicada à ésteres, bem como a outros compostos químicos de baixo-médio valor de venda.

Um estudo com lipases imobilizadas não-comerciais, englobando uma análise preliminar técnico-econômica de sua obtenção para estimativa de seu custo, pode ajudar na obtenção de biocatalisadores aptos a suportarem os efeitos dos reagentes de cadeia curta nos sistemas multicompetitivos com suportes de imobilização aptos a garantir alta capacidade de reuso em diferentes esquemas reacionais.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, H.; COMEAU, L. Aroma synthesis by immobilized lipase from *Mucor sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, n. 5, p. 589–595, 2003.
- ABDELMOEZ, W.; MUSTAFA, A. Oleochemical industry future through biotechnology. **Journal of Oleo Science**, v. 63, n. 6, p. 545–554, 2014.
- ABELLANAS-PEREZ, P.; CARBALLARES, D.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ROCHA-MARTIN, J. Glutaraldehyde modification of lipases immobilized on octyl agarose beads: Roles of the support enzyme loading and chemical amination of the enzyme on the final enzyme features. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 248, p. 125853, 2023.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilization and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; BARROS, D. S. N. DE; SOUSA, H.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FREIRE, D. M. G. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from *Rhizomucor miehei* grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. **Renewable Energy**, v. 113, p. 112–118, 2017.
- AGUIEIRAS, ERIKA C G; CASTRO, A. M. DE; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Síntese de biodiesel via transesterificação do óleo ácido de macaúba (*Acrocomia aculeata*) utilizando preparados enzimáticos sólidos como biocatalisadores. In: **XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC**, Caxias do Sul, 2016, p. 2014–2017.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; CASTRO, A. M. DE; LANGONE, M. A. P.; FREIRE, D. M. G. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; PAPADAKI, A.; MALLOUCHOS, A.; MANDALA, I.; SOUSA, H.; FREIRE, D. M. G.; KOUTINAS, A. A. Enzymatic synthesis of bio-based wax esters from palm and soybean fatty acids using crude lipases produced on agricultural residues. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. October 2018, p. 111499, 2019.
- AGUIEIRAS, ERIKA C.G.; RIBEIRO, D. S.; COUTEIRO, P. P.; BASTOS, C. M. B.; QUEIROZ, D. S. DE; PARREIRA, J. M.; LANGONE, M. A. P. Investigation of the Reuse of Immobilized Lipases in Biodiesel Synthesis: Influence of Different Solvents in Lipase Activity. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 179, n. 3, p. 485–496, 2016.
- AL-ZUHAIR S, ALMENHALI A, HAMAD I, ALSHEHHI M, A. N.; MOHAMED, S. Enzymatic production of biodiesel from used/waste vegetable oils: Design of a pilot plant. **Renewable energy**, v. 36, n. 10, p. 2605–2614, 2011.
- ALIBABA. Alibaba. Disponível em: <<https://www.alibaba.com/>>. Acesso em 4 de Outubro de 2024.
- ALJAWISH, A.; HEUSON, E.; BIGAN, M.; FROIDEVAUX, R. Lipase catalyzed

esterification of formic acid in solvent and solvent-free systems. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 20, n. June, p. 101221, 2019.

ALLINGER, N. L.; CAVA, M. P.; JONGH, D. C.; JOHNSON, C. R.; LEBEL, N.; STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1976.

ALVES, J. S.; GARCIA-GALAN, C.; SCHEIN, M. F.; SILVA, A. M.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Combined effects of ultrasound and immobilization protocol on butyl acetate synthesis catalyzed by CALB. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 9562–9576, 2014.

ALVES, M. D.; CREN, É. C.; MENDES, A. A. Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S377–S387, 2016.

ANASTAS, P.; EGHBALI, N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, n. 1, p. 301–312, 2010.

ANDRADE, T. A.; MARTÍN, M.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Biodiesel production catalyzed by liquid and immobilized enzymes: Optimization and economic analysis. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 141, p. 1–14, 2019.

ANOBOM, C. D.; PINHEIRO, A. S.; DE-ANDRADE, R. A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; ANDRADE, G. C.; MOURA, M. V.; ALMEIDA, R. V.; FREIRE, D. M. From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

ANSCHAU, A.; HUERTA, K. DA M.; RÊGO, T. V.; OLIVEIRA, J. M. G. DE; BORBA, C. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. DE M. Enzymatic synthesis optimization of isoamyl butyrate from fusel oil. **Acta Scientiarum - Biological Sciences**, v. 43, p. 1–13, 2021.

ANSORGE-SCHUMACHER, M. B.; THUM, O. Immobilised lipases in the cosmetics industry. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6475–6490, 2013.

ARANA-PEÑA, S.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; RIOS, N. S.; ORTIZ, C.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. New applications of glyoxyl-octyl agarose in lipases co-immobilization: Strategies to reuse the most stable lipase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 989–997, 2019.

ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; CARBALLARES, D.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. **Catalysis Today**, v. 362, n. November 2019, p. 130–140, 2021.

ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; CARBALLARES, D.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; LOKHA, Y.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. February, p. 1–13, 2020.

ARROYO, M.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; SINISTERRA, J. V. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 1, p. 3–12, 1999.

ARSAN, JAD; PARKIN, K. L. Selectivity of *Rhizomucor miehei* lipase as affected by choice of cosubstrate system in ester modification reactions in organic media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 2, p. 222–226, 2000.

ARSAN, J.; PARKIN, K. L. Selectivity of *Candida antarctica* B lipase toward fatty acid and (Iso)propanol substrates in esterification reactions in organic media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 3738–3743, 2000.

ASESCHEM. Wholesale Cosmetic Ingredients Supplier | Wholesale Chemical Supplier. Disponível em: <<https://ases.in/>>. Acesso em: 4 de Outubro de 2024.

ATTARBACHI, T.; KINGSLEY, M. D.; SPALLINA, V. New trends on crude glycerol purification: A review. **Fuel**, v. 340, n. January, p. 127485, 2023.

BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; BRASK, J. Preparation of highly reusable biocatalysts by immobilization of lipases on epoxy-functionalized silica for production of biodiesel from canola oil. *Biochemical Engineering Journal*, v. 101, p. 23–31, 2015.

BABAKI, M.; YOUSEFI, M.; HABIBI, Z.; BRASK, J.; MOHAMMADI, M. Enzymatic production of biodiesel using lipases immobilized on silica nanoparticles as highly reusable biocatalysts: effect of water, *t*-butanol and blue silica gel contents Mohadese Babaki. **Biochemical Engineering Journal**, v. 101, p. 23–31, 2016.

BABAVATAN, E. O.; YILDIRIM, D.; PEKSEL, A.; BINAY, B. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto montmorillonite K-10 and polyvinyl alcohol gel. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 38, n. 4, p. 274–282, 2020.

BAEK, Y.; LEE, JONGHWA; SON, J.; LEE, T.; SOBHAN, A.; LEE, JINYOUNG; KOO, S. M.; SHIN, W. H.; OH, J. M.; PARK, C. Enzymatic synthesis of formate ester through immobilized lipase and its reuse. **Polymers**, v. 12, n. 8, 2020.

BALCÃO, V. M.; PAIVA, A. L.; MALCATA, F. X. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 0229, n. 95, p. 392–416, 1996.

BANIK, S. D.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M.; PETERS, G. H. A Correlation between the Activity of *Candida antarctica* Lipase B and Differences in Binding Free Energies of Organic Solvent and Substrate. **ACS Catalysis**, v. 6, p. 6350–6361, 2016.

BANIK, S. D.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M.; PETERS, G. H. Effect of Water Clustering on the Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Medium. **Catalysts**, v. 7, n. 227, p. 1–18, 2017.

BASKAR, G.; AISWARYA, R.; SOUMIYA, S.; MOHANAPRIYA, N.; NIVETHA, S. R. Recent Advances in Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production. **Journal of Energy and Environmental Sustainability**, v. 4, p. 1-5, 2017.

BAUM, S.; MUELLER, J. J.; HILTERHAUS, L.; ECKSTEIN, M.; THUM, O.; LIESE, A. The bubble column reactor: A novel reactor type for cosmetic esters. In: **Applied Biocatalysis: From Fundamental Science to Industrial Applications**, p. 343–366, 2016.

BAYRAMOĞLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 1, p. 372–378, 2011.

BÉLAFI-BAKÓ, K.; BADR, A. K.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L. Kinetics of Ethyl Acetate Formation by Lipase in Organic Solvent and Solvent-Free System. **Chemical Papers**, v. 57, n. 3, p. 278–281, 2003.

BERGER, M.; SCHNEIDER, M. P. Lipases in organic solvents: The fatty acid chain length profile. **Biotechnology Letters**, v. 13, n. 9, p. 641–645, 1991.

BERNAL, C.; ILLANES, A.; WILSON, L. Heterofunctional Hydrophilic–Hydrophobic Porous Silica as Support for Multipoint Covalent Immobilization of Lipases: Application to Lactulose Palmitate Synthesis. **Langmuir**, v. 30, n. 12, p. 3557–3566, 1 abr. 2014.

BEZBRADICA, D.; MIJIN, D.; ŠILER-MARINKOVIĆ, S.; KNEŽEVIĆ, Z. The effect of substrate polarity on the lipase-catalyzed synthesis of aroma esters in solvent-free systems. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 45, n. 3–4, p. 97–101, 2007.

BHAVSAR, K. V.; YADAV, G. D. Process intensification by microwave irradiation in immobilized-lipase catalysis in solvent-free synthesis of ethyl valerate. **Molecular Catalysis**, v. 461, n. September, p. 34–39, 2018.

BOHNENKAMP, A. C.; KRUIS, A. J.; MARS, A. E.; WIJFFELS, R. H.; OOST, J. VAN DER; KENGEN, S. W. M.; WEUSTHUIS, R. A. Biotechnology for Biofuels Multilevel optimisation of anaerobic ethyl acetate production in engineered *Escherichia coli*. **Biotechnology for Biofuels**, p. 1–14, 2020.

BOLIVAR, J. M.; WOODLEY, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, n. 15, p. 6251–6290, 15 jul. 2022.

BRANCO, R. J. F.; GRABER, M.; DENIS, V.; PLEISS, J. Molecular mechanism of the hydration of *Candida antarctica* lipase B in the gas phase: Water adsorption isotherms and molecular dynamics simulations. **ChemBioChem**, v. 10, n. 18, p. 2913–2919, 2009.

CAI, Z. Z.; WU, S. Q.; SUN, G.; NIU, Y.; ZHENG, D.; PENG, S. Y.; YANG, W. Z.; WANG, Y.; YANG, D. High-Purity Fatty Acid *n*-Octyl Esters from Housefly (*Musca domestica* L.) Larval Lipids, a Potential New Biolubricant Source. **Energy and Fuels**, v. 31, n. 10, p. 10966–10974, 2017.

CAMBOU, B.; KLIBANOV, A. M. Comparison of Different Strategies for the Lipase-Catalyzed Preparative Resolution of Racemic Acids and Alcohols: Asymmetric Hydrolysis, Esterification, and Transesterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 26, n. 2, 1984.

CASTILLO, E.; TORRES-GAVILLAN, A.; SANDOVAL, G.; MARTY, A.

Thermodynamical Methods for Optimization of Lipase-Catalyzed Reactions. In: **Lipases and Phospholipases: Methods and Protocols** p. 383–400. 2012

CAVALLARO, V.; ERCOLI, D. R.; TONETTO, G. M. Simple and economical CALB/polyethylene/aluminum biocatalyst for fatty acid esterification. **Polymers Advanced Technologies**, v. 29, n. 2, p. 1–5, 2017.

CEBRIÁN-GARCÍA, S.; BALU, A. M.; LUQUE, R. Ultrasound-assisted esterification of valeric acid to alkyl valerates promoted by biosilicified lipases. **Frontiers in Chemistry**, v. 6, n. JUN, p. 1–7, 2018.

CECILIA, J. A.; PLATA, D. B.; SABOYA, R. M. A.; LUNA, F. M. T. DE; CAVALCANTE, C. L.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E. An overview of the biolubricant production process: Challenges and future perspectives. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 1–24, 2020.

CHANDRA, P.; ENESPA; SINGH, R.; ARORA, P. K. Microbial lipases and their industrial applications: A comprehensive review. [s.l.] **BioMed Central**, 2020. v. 19

CHANG, S.-W.; SHAW, J.-F.; YANG, K.-H.; SHIH, I.-L.; HSIEH, C.-H.; SHIEH, C.-J. Optimal lipase-catalyzed formation of hexyl laurate. **Green Chemistry**, v. 7, n. 7, p. 547, 2005.

CHEMICALBOOK. ChemicalBook---Chemical Search Engine. Disponível em: <<https://www.chemicalbook.com/>>. Acesso em: 4 de Outubro de 2024.

Chemical Distribution and Ingredient Supplier | ChemCentral Marketplace | ChemCentral.com. Disponível em: <<https://www.chemcentral.com/>>. Acesso em: 4 de Outubro de 2024.

CHEN, C. S.; FUJIMOTO, Y.; GIRDAUKAS, G.; SIH, C. J. Quantitative analyses of biochemical kinetic resolutions of enantiomers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, n. 25, p. 7294–7299, 1 dez. 1982.

CHEN, J.-W.; WU, W.-T. Regeneration of immobilized *Candida antarctica* lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 466–469, 2003.

CHEN, J.; ZHANG, Y.; ZHONG, H.; ZHU, H.; WANG, H.; GOH, K. L.; ZHANG, J.; ZHENG, M. Efficient and sustainable preparation of cinnamic acid flavor esters by immobilized lipase microarray. **LWT**, v. 173, p. 114322, 1 jan. 2023.

CHOONG, T. S. Y.; YEOH, C. M.; PHUAH, E. T.; SIEW, W. L.; LEE, Y. Y.; TANG, T. K.; ABDULLAH, L. C. Kinetic study of lipase-catalyzed glycerolysis of palm olein using Lipzyme TLIM in solvent-free system. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–13, 2018.

CHOUDHURRY, H. A.; CHAKMA, S.; MOHOLKAR, V. S. Biomass Gasification Integrated Fischer-Tropsch Synthesis: Perspectives, Opportunities and Challenges. In: **Recent Advances in Thermochemical Conversion of Biomass**. [s.l.: s.n.]. p. 383–435.

CHOWDARY, G. V; RAMESH, M. N.; PRAPULLA, S. G. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis.

Process Biochemistry, v. 36, n. 4, p. 331–339, 2000.

CHOWDHURY, A.; MITRA, D. A kinetic study on the Novozyme 435-catalyzed esterification of free fatty acids with octanol to produce octyl esters. **Biotechnology Progress**, v. 31, n. 6, p. 1494–1499, 2015.

CHULALAKSANANUKUL, W.; CONDORET, J. S.; DELORME, P.; WILLEMOT, R. M. Kinetic study of esterification by immobilized lipase in n-hexane. **FEBS Letters**, v. 276, n. 1–2, p. 181–184, 1990.

CHUN MINH, A. L.; SAMUDRALA, S. P.; BHATTACHARYA, S. Valorisation of glycerol through catalytic hydrogenolysis routes for sustainable production of value-added C3 chemicals: current and future trends. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 6, n. 3, p. 596–639, 2022.

CIPOLATTI, E. P.; PINTO, M. C. C.; ROBERT, J. DE M.; SILVA, T. P. DA; BERALTO, T. DA C.; SANTOS, J. G. F.; CASTRO, R. DE P. V. DE; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MANOEL, E. A.; PINTO, J. C.; FREIRE, D. M. G. Pilot-scale development of core-shell polymer supports for the immobilization of recombinant lipase B from *Candida antarctica* and their application in the production of ethyl esters from residual fatty acids. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 40, p. 1–13, 2018.

CLAON, P. A.; AKOH, C. C. Enzymatic Synthesis of Geraniol and Citronellol Esters by Direct Esterification in *n*-Hexane. **Biotechnology Letters**, v. 15, n. 12, p. 1988–1993, 1993.

COELHO, A. L. S.; ORLANDELLI, R. C. Immobilized microbial lipases in the food industry: a systematic literature review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–15, 2020.

COLLAÇO, A. C. A.; AGUIEIRAS, E. C. G.; SANTOS, J. G.; OLIVEIRA, R. A. DE; PAULA VIEIRA DE CASTRO, R. DE; FREIRE, D. M. G. Experimental study and preliminary economic evaluation of enzymatic biodiesel production by an integrated process using co-products from palm (*Elaeis guineensis* Jaquim) industry. **Industrial Crops and Products**, v. 157, n. June, p. 112904, 2020.

COLOMBIÉ, S.; TWEDDELL, R. J.; CONDORET, J. S.; MARTY, A. Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 3, p. 362–368, 1998.

CONDORET, J. S.; VANKAN, S.; JOULIA, X.; MARTY, A. Prediction of water adsorption curves for heterogeneous biocatalysis in organic and supercritical solvents. **Chemical Engineering Science**, v. 52, n. 2, p. 213–220, 1997.

CORRÊA, I. N. S.; SILVA, S. S. P.; QUEIROZ, D. S.; ROSAS, D. O.; LANGONE, M. A. P. Enzymatic synthesis of dioctyl sebacate. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. S166–S171, 2016.

COUTO, R.; VIDINHA, P.; RIBEIRO, A. S.; FERREIRA, O.; OLIVEIRA, M. V.; MACEDO, A.; LOUREIRO, M.; BARREIROS, S. Geranyl Acetate Synthesis in a Packed-Bed Reactor Catalyzed by Novozym in Supercritical Carbon Dioxide and in Supercritical

Ethane. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 50, p. 1938–1946, 2011.

DAI, W. C.; CHIU, S. J.; HUANG, D. Y.; JUAN, H. Y.; CHEN, C. Y.; CHEN, S. S.; SU, C. H.; LI, S. Y. Lipase-catalyzed synthesis of butyl propionate in solvent-free system: Optimization by response surface methodology. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 5, p. 2233–2237, 2014.

DATTA, S.; CHRISTENA, L. R.; RAJARAM, Y. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **3 BIOTECH**, v. 3, p. 1–9, 2013.

DECHEMA AUSSTELLUNGS-GMBH. Chemical industry tackles biggest transformation in its history - AICHEMA. Disponível em: <<https://www.achema.de/en/press/trend-reports/chemical-industry-tackles-biggest-transformation-in-its-history>>. Acesso em: 13 de Outubro 2024.

DELEUZE, H.; LANGRAND, G.; MILLET, H.; BARATTI, J.; BUONO, G.; TRIANTAPHYLIDES, C. Lipase-catalyzed reactions in organic media: competition and applications. **Biochimica et biophysica acta**, v. 911, n. 1, p. 117–120, jan. 1987.

DIAZ, M. D. R.; GÓMEZ, J. M.; DÍAZ-SUELTO, B.; GARCÍA-SANZ, A. Enzymatic synthesis of short-chain esters in n-hexane and supercritical carbon dioxide: Effect of the acid chain length. **Engineering in Life Sciences**, v. 10, n. 2, p. 171–176, 2010.

DUAN, Z.-Q.; DU, W.; LIU, D.-H. The pronounced effect of water activity on the positional selectivity of Novozym 435 during 1,3-diolein synthesis by esterification. **Catalysis Communications**, v. 11, n. 5, p. 356–358, 2010.

DUDUKOVIC, M. P.; LARACHI, F.; MILLS, P. Multiphase Catalytic Reactors: A Perspective on Current Knowledge and Multiphase catalytic reactors: a perspective on current knowledge and future trends. **Catalysis Reviews**, n. March 2018, 2007.

DUDUKOVIC, M. P.; LARACHI, F.; MILLS, P. L. Multiphase reactors revisited. **Chemical Engineering Science**, v. 54, n. 1999, p. 1975–1995, 1999.

DUTRA, L. DA S.; COSTA CERQUEIRA PINTO, M.; CIPOLATTI, E. P.; AGUIEIRAS, E. C. G.; MANOEL, E. A.; GRECO-DUARTE, J.; GUIMARÃES FREIRE, D. M.; PINTO, J. C. How the biodiesel from immobilized enzymes production is going on: An advanced bibliometric evaluation of global research. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 153, n. October 2021, 2022.

EYSKENS, I.; BUEKENHOUDT, A.; NAHRA, F.; ORMEROD, D. Fractionation of fatty acid alkyl ester mixtures and opportunities for large-scale separation. **Trends in Chemical Engineering**, v. 18, p. 77–112, 2020.

FABER, M. O. Aproveitamento Biotecnológico da Glicerina Residual do Biodiesel para geração de Hidrogênio, 1,3-Propanodiol e Metano. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2021.

FALLAVENA, L. P.; ANTUNES, F. H. F.; ALVES, J. S.; PALUDO, N.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Ultrasound technology and molecular

sieves improve the thermodynamically controlled esterification of butyric acid mediated by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **RSC Advances**, v. 4, n. 17, p. 8675–8681, 2014.

FELLECHNER, O.; BLATKIEWICZ, M.; SMIRNOVA, I. Reactive Separations for In Situ Product Removal of Enzymatic Reactions: A Review. **Chemie-Ingenieur-Technik**, v. 91, n. 11, p. 1522–1543, 2019.

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

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and physics of lipids*, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, jun. 1998.

FERNANDEZ-LOPEZ, L.; PEDRERO, S. G.; LOPEZ-CARROBLES, N.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; GORINES, B. C.; OTERO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Physical crosslinking of lipase from *Rhizomucor miehei* immobilized on octyl agarose via coating with ionic polymers: Avoiding enzyme release from the support. **Process Biochemistry**, v. 54, p. 81–88, 1 mar. 2017.

FERNANDEZ-LORENTE, G.; FILICE, M.; LOPEZ-VELA, D.; PIZARRO, C.; WILSON, L.; BETANCOR, L.; AVILA, Y.; GUISAN, J. M. Cross-Linking of Lipases Adsorbed on Hydrophobic Supports: Highly Selective Hydrolysis of Fish Oil Catalyzed by RML. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 6, p. 801–807, 1 jun. 2011.

FIESER, L. F.; FIESER, M. **Basic Organic Chemistry**. Boston: D.C. Heath and Company, 1959.

FILHO, D. G.; SILVA, A. G.; GUIDINI, C. Z. Lipases: sources , immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, 2019.

FLETA, M. L. Added-value milk fat derivatives from integrated processes using supercritical technology. [s.l.] Delft Technical University, 2010.

FLORES, M. V; SEWALT, J. J. W.; JANSSEN, A. E. M.; PADT, A. VAN DER. The Nature of Fatty Acid Modifies the Equilibrium Position in the Esterification Catalyzed by Lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 3, p. 364–371, 2000.

FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L. Solvent-free ethyl oleate synthesis mediated by lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on polypropylene powder. **Catalysis Today**, v. 107–108, p. 23–30, 2005.

FORESTI, M. L.; PEDERNERA, M.; BUCALÁ, V.; FERREIRA, M. L. Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 1–2, p. 62–70, 2007.

FORESTI, M. L.; PEDERNERA, M.; FERREIRA, M. L.; BUCALÁ, V. Kinetic modeling of

enzymatic ethyl oleate synthesis carried out in biphasic systems. **Applied Catalysis A: General**, v. 334, n. 1–2, p. 65–72, 2008.

Formulator Sample Shop. Disponível em: <<https://www.formulatorsampleshop.com/>>. Acesso em: 04 de Outubro de 2024.

FORRET, A.; SCHWEITZER, J. M.; GAUTHIER, T.; KRISHNA, R.; SCHWEICH, D. Scale Up of Slurry Bubble Reactors. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 61, n. 3, p. 443–458, 2006.

FREITAS, L.; PEREZ, V. H.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. DE. Enzymatic Synthesis of Glyceride Esters in Solvent-Free System: Influence of the Molar Ratio, Lipase Source and Functional Activating Agent of the Support. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 7, p. 1360–1366, 2007.

FRIEDRICH, J. L. R.; PEÑA, F. P.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 88, n. 6, p. 1089–1095, 2012.

FU, X.; PARKIN, K. L. Selectivity of fatty acid incorporation into acylglycerols in esterification reactions using *Rhizomucor miehei* and *Burkholderia cepacia* lipases. **Food Research International**, v. 37, p. 651–657, 2004.

GADEKAR-SHINDE, S.; WALEKAR, P.; PATIL-SHINDE, V.; PATIL, S. S.; DESHANNAVAR, U. B.; SHETTI, N. P. Separation of C1-C6 alcohol/ester/water system in continuous reactive distillation unit a thermodynamic analysis. **Materials Science for Energy Technologies**, v. 6, p. 48–64, 2023.

GANDHI, N. N.; PATIL, N. S.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B.; WANGIKAR, P.; MUKESH, D. Lipase-Catalyzed Esterification. **Catalysis Reviews**, v. 42, n. 4, p. 439–480, 2000.

GANDHI, N. N.; SAWANT, S. B.; JOSHI, J. B. Studies on the lipozyme-catalyzed synthesis of butyl laurate. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, n. 1, p. 1–12, 1995.

GAO, S.; WANG, W.; WANG, Y.; LUO, G.; DAI, Y. Bioresource Technology Influence of alcohol treatments on the activity of lipases immobilized on methyl-modified silica aerogels. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 19, p. 7231–7238, 2010.

GAO, W.; WU, K.; CHEN, L.; FAN, H.; ZHAO, Z.; GAO, B.; WANG, H.; WEI, D. A novel esterase from a marine mud metagenomic library for biocatalytic synthesis of short-chain flavor esters. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–12, 2016.

GARCÍA-ALLES, L. F.; GOTOR, V. Alcohol Inhibition and Specificity Studies of Lipase B from *Candida antarctica* in Organic Solvents. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, p. 163–170, 1998.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, n. 16, p. 2885–2904, 2011.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty esters. Part I. Kinetic approach. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, n. 7, p. 584–590, 1999.

GARCIA, T.; SANCHEZ, N.; MARTINEZ, M.; ARACIL, J. Enzymatic synthesis of fatty esters Part II . Optimization studies. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 591–597, 1999.

GAWAS, S. D.; JADHAV, S. V.; RATHOD, V. K. Solvent Free Lipase Catalysed Synthesis of Ethyl Laurate: Optimization and Kinetic Studies. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 7, p. 1428–1445, 2016.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; BEZZINE, S.; MILED, N.; GARGOURI, Y. Production of isoamyl acetate with immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 6, p. 788–794, 2006.

GHAMGUI, H.; KARRA-CHAABOUNI, M.; GARGOURI, Y. 1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from *Rhizopus oryzae*: A comparative study between n-hexane and solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, n. 4, p. 355–363, 2004.

GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, p. 125368, 2020.

Global labor. Disponível em: <<https://www.globallabor.com.br/>>. Acesso em: 04 de Outubro de 2024.

GOLDBERG, M.; THOMAS, D.; LEGOY, M. D. Water activity as a key parameter of synthesis reactions: The example of lipase in biphasic (liquid/solid) media. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 12, n. 12, p. 976–981, 1990.

GÓMEZ, F. J.; OXANA SAIMO; WORLD ECONOMIC FORUM. Deep Dive into the chemical industry: What defines its transformation and why does it matter? Disponível em: <<https://www.weforum.org/stories/2024/01/chemical-industry-transformation/>>. Acesso em 13 de Outubro de 2024.

GRAEBIN, N. G.; MARTINS, A. B.; LORENZONI, A. S. G.; GARCIA-GALAN, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene-divinylbenzene beads improves butyl acetate synthesis. **Biotechnology Progress**, v. 28, n. 2, p. 406–412, 2012.

GUBICZA, L.; KABIRI-BADR, A.; KEOVES, E.; BELAFI-BAKO, K. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. **Journal of Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 193–196, 2000.

GUISAN, J. M. **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. [s.l.] HUMANA PRESS INC, 2006.

GUMEL, A. M.; ANNUAR, M. S. M. *Thermomyces lanuginosus* lipase-catalyzed synthesis of natural flavor esters in a continuous flow microreactor. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1–12, 1 dez. 2016.

GUPTA, V. K.; ALI, I.; SALEH, T. A.; NAYAK, A.; AGARWAL, S. Chemical treatment technologies for waste-water recycling — an overview. **RSC Adv.**, v. 2, p. 6380–6388, 2012.

GÜVENÇ, A.; KAPUCU, N.; MEHMETOĞLU, Ü. The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. **Process Biochemistry**, v. 38, n. 3, p. 379–386, 2002.

HAIGH, K.; ABIDIN, S. Z.; ABDULLAH, P. A.; SAHA, B. Pretreatment of Used Cooking Oil for the Preparation of Biodiesel Using Heterogeneous Catalysis Pretreatment of Used Cooking Oil for the Preparation of Biodiesel using Heterogeneous Catalysis. **Progress in Colloid & Polymer Science**, 2012.

HALLING, P. J. Solvent Selection for Biocatalysis in Mainly Organic Systems: Predictions of Effects on Equilibrium Position. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 691–701, 1990.

HALLING, P. J. Thermodynamic predictions for biocatalysis in nonconventional media: Theory, tests, and recommendations for experimental design and analysis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 16, n. 3, p. 178–206, 1994.

HALLING, P. J.; FINNEY, J. L.; HO, M. W.; FRANKS, F.; LITTLECHILD, J. A. What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1448, p. 1287–1297, 2004.

HARI KRISHNA, S.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, v. 87, n. 3, p. 193–201, 2001.

HARI KRISHNA, S.; KARANTH, N. G. Lipases and Lipase-Catalyzed Esterification Reactions in Nonaqueous Media. **Catalysis Reviews**, v. 44, n. 4, p. 499–591, 2002.

HARI KRISHNA, S.; SATTUR, A. P.; KARANTH, N. G. Lipase-catalyzed synthesis of isoamyl isobutyrate - Optimization using a central composite rotatable design. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 1, p. 9–16, 2001.

HARTMEIER, W. **Immobilized Biocatalysts - an Introduction**. 1. ed. Berlin: Springer Verlag, 1986.

HASEGAWA, S.; AZUMA, M.; TAKAHASHI, K. Enzymatic esterification of lactic acid, utilizing the basicity of particular polar organic solvents to suppress the acidity. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, p. 1503–1510, 2008.

HERNÁNDEZ-MARTÍN, E.; OTERO, C. Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym 435 and Lipozyme TL IM. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 277–286, 2008.

HILTERHAUS, L.; THUM, O.; LIESE, A. Reactor Concept for Lipase-Catalyzed Solvent-Free Conversion of Highly Viscous Reactants Forming Two-Phase Systems. **Organic Process Research & Development**, v. 12, n. 4, p. 618–625, 1 jul. 2008.

HIRATA, D. B.; ALBUQUERQUE, T. L.; RUEDA, N.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M.; GARCIA-VERDUGO, E.; PORCAR, R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Advantages of Heterofunctional Octyl Supports: Production of 1,2-Dibutylin by Specific and Selective Hydrolysis of Tributyrin Catalyzed by Immobilized Lipases. **ChemistrySelect**, v. 1, n. 12, p. 3259–3270, 1 ago. 2016.

HIRATA, D. B.; ALBUQUERQUE, T. L.; RUEDA, N.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different immobilized lipases in transesterification reactions using tributyrin: Advantages of the heterofunctional octyl agarose beads. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 133, p. 117–123, 2016.

HUANG, S. Y.; CHANG, H. L.; GOTO, M. Preparation of Surfactant-Coated Lipase for the Esterification of Geraniol and Acetic Acid in Organic Solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, n. 7, p. 552–557, 1998.

HUSSIN, N. H.; WAHAB, R. A.; ELIAS, N.; JACOB, A. G.; ZAINAL-ABIDIN, M. H.; ABDULLAH, F.; SULAIMAN, N. J.; MISSON, M. Electrospun magnetic nanocellulose–polyethersulfone-conjugated aspergillus oryzae lipase for synthesis of ethyl valerate. **Membranes**, v. 11, n. 12, 2021.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 550–563, 2012.

IKEDA, Y.; KUROKAWA, Y. Synthesis of Geranyl Acetate by Lipase Entrap-Immobilized in Cellulose Acetate-TiO₂ Gel Fiber. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 11, p. 1099–1103, 2001.

IMAGENET TECNOLOGIA. Etanol - Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada - CEPEA-Esalq/USP. Disponível em: <<https://www.cepea.org.br/br/indicador/etanol.aspx>>. Acesso em 4 de Outubro de 2024.

Import Export Data | Zaub. Disponível em: <https://www.zaub.com/shipment_search>. Acesso em 4 de Outubro de 2024.

ISHAK, N.; LAJIS, A. F. B. Kinetics and Optimization of Lipophilic Kojic Acid Derivative Synthesis in Polar Aprotic Solvent Using. **Molecules**, v. 23, n. 501, p. 1–24, 2018.

JAISWAL, K. S.; RATHOD, V. K. Enzymatic synthesis of cosmetic grade wax ester in solvent free system: optimization, kinetic and thermodynamic studies. **SN Applied Sciences**, v. 1, n. 8, p. 1–11, 2019.

JANKOVI, T.; STRAATHOF, A. J. J.; KISS, A. A. Advanced downstream processing for sustainable ethyl acetate production by fermentation. **AIChE Journal**, v. 71, p. 1–18, 2025.

JENAB, E.; TEMELLI, F.; CURTIS, J. M.; ZHAO, Y. Performance of two immobilized lipases for interesterification between canola oil and fully-hydrogenated canola oil under supercritical carbon dioxide. **LWT - Food Science and Technology**, v. 58, n. 1, p. 263–271, 2014.

JIN, C.; YAO, M.; LIU, H.; LEE, C. F.; JI, J. Progress in the production and application of n-butanol as a biofuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, n. 8, p. 4080–4106, 2011.

JOSÉ, C.; BONETTO, R. D.; GAMBARO, L. A.; GUAUQUE TORRES, M. D. P.; FORESTI, M. L.; FERREIRA, M. L.; BRIAND, L. E. Investigation of the causes of deactivation–degradation of the commercial biocatalyst Novozym® 435 in ethanol and ethanol–aqueous media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 71, n. 3–4, p. 95–107, 1 set. 2011.

JUNIOR, J. M.; MATTOS, F. R.; COSTA, G. R.; ZURLO, A. B. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; MENDES, A. A. Improved Catalytic Performance of Lipase Eversa® Transform 2.0 via Immobilization for the Sustainable Production of Flavor Esters—Adsorption Process and Environmental Assessment Studies. **Catalysts**, v. 12, n. 11, p. 1–19, 2022.

KAMLET, M. J.; ABBOUD, J. M.; ABRAHAM, M. H.; TAFT, R. W. Linear Solvation Energy Relationships. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters σ , σ^* , α , and β , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. **Journal of Organic Chemistry**, v. 48, n. 14, p. 2877–2887, 1983.

KAMLET, M. J.; TAFT, R. W. Linear Solvation Energy Relationships. Local Empirical Rules - or Fundamental Laws of Chemistry? A reply to the Chemometricians. **Acta Chemica Scandinavica B**, v. 39, p. 611–628, 1985.

KANTARCI, N.; BORAK, F.; ULGEN, K. O. Bubble column reactors. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2263–2283, 2005.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KARIMI ESTAHBANATI, M. R.; FEILIZADEH, M.; ATTAR, F.; ILIUTA, M. C. Current Developments and Future Trends in Photocatalytic Glycerol Valorization: Photocatalyst Development. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 52, p. 22330–22352, 30 dez. 2020.

KASHID, M. N.; KIWI-MINSKER, L. Microstructured Reactors for Multiphase Reactions : State of the Art. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, p. 6465–6485, 2009.

KAUR, J.; KUMAR, A.; KUMAR, M.; GERA, P. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues. **Biotechnology Reports**, v. 27, p. e00487, 2020.

KEMPERS, P.; SCHÖRKEN, U.; KAWA, R.; SCHWARZER, J.; WOLF, T. Ester Synthesis United States, 2016.

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

KHAN, Z.; JAVED, F.; SHAMAIR, Z.; HAFEEZ, A.; FAZAL, T.; ASLAM, A.;

ZIMMERMAN, W. B.; REHMAN, F. Current developments in esterification reaction: A review on process and parameters. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 103, p. 80–101, 2021.

KHOR, G. K.; SIM, J. H.; KAMARUDDIN, A. H.; UZIR, M. H. Thermodynamics and inhibition studies of Lipozyme TL IM in biodiesel production via enzymatic transesterification. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 16, p. 6558–6561, 2010.

KIRK, O.; BJÖRKLING, F.; GODTFREDSEN, S. E.; LARSEN, T. O.; KIRK, O.; BJÖRKLING, F.; GODTFREDSEN, S. E.; LARSEN, T. O. Fatty Acid Specificity in Lipase-Catalyzed Synthesis of Glucoside Esters. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 6, n. 2, p. 127–134, 1992.

KLIBANOV, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. **Nature**, v. 409, n. 6817, p. 241–246, 2001.

KONZOCK, O.; NIELSEN, J. TRYing to evaluate production costs in microbial biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 42, n. 11, p. 1339–1347, 2024.

KOSHLAND, D. E. Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 44, n. 2, p. 98–104, 1 fev. 1958.

KRUIS, A. J.; BOHNENKAMP, A. C.; PATINIOS, C.; NULAND, Y. M. VAN; LEVISSON, M.; MARS, A. E.; BERG, C. VAN DEN; KENGEN, S. W. M.; WEUSTHUIS, R. A. Microbial production of short and medium chain esters: Enzymes, pathways, and applications. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 7, p. 107407, 2019.

KULKARNI, A. V; JOSHI, J. B. Chemical Engineering Research and Design Design and selection of sparger for bubble column reactor. Part I: Performance of different spargers. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 89, n. 10, p. 1972–1985, 2011.

KUMAR, A.; SHARMA, V.; SHARMA, P.; KANWAR, S. S. Effective immobilisation of lipase to enhance esterification potential and reusability. **Chemical Papers**, v. 67, n. 7, p. 696–702, 2013.

KUMARI, A.; MAHAPATRA, P.; KUMAR, G. V.; BANERJEE, R. Comparative study of thermostability and ester synthesis ability of free and immobilized lipases on cross linked silica gel. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 31, n. 4, p. 291–298, 2008.

KUO, C.; CHEN, H.; CHEN, J.; LIU, Y. High Yield of Wax Ester Synthesized from Cetyl Alcohol and Octanoic Acid by Lipozyme RM IM and Novozym 435. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 11694–11704, 2012.

KUO, S.; PARKIN, K. L. Solvent Polarity Influences Product Selectivity of Lipase-Mediated Esterification Reactions in Microaqueous Media. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 11, p. 1427–1433, 1996.

KUPERKAR, V. V.; LADE, V. G.; PRAKASH, A.; RATHOD, V. K. Synthesis of isobutyl propionate using immobilized lipase in a solvent free system: Optimization and kinetic studies. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 143–149, 2014.

KÜTT, A.; SELBERG, S.; KALJURAND, I.; TSHEPELEVITSH, S.; HEERING, A.; DARNELL, A.; KAUPMEES, K.; PIIRSALU, M.; LEITO, I. pKa values in organic chemistry – Making maximum use of the available data. **Tetrahedron Letters**, v. 59, n. 42, p. 3738–3748, 2018.

LAANE, C.; BOEREN, S.; VOS, K.; VEEGER, C. Rules for Optimization of Biocatalysis in Organic Solvent. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 81–87, 1987.

LANGRAND, G.; RONDOT, N.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Short chain flavour esters synthesis by microbial lipases. **Biotechnology Letters**, v. 12, n. 8, p. 581–586, 1990.

LANGRAND, G.; TRIANTAPHYLIDES, C.; BARATTI, J. Lipase Catalyzed Formation of Flavour Esters. **Biotechnology Letters**, v. i, n. 8, p. 549–554, 1988.

LAUDANI, C. G.; GIOVANNA, K. Æ.; PORTA, D. Optimisation of n-octyl oleate enzymatic synthesis over *Rhizomucor miehei* lipase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 29, p. 119–127, 2006.

LEE, C. H.; PARKIN, K. L. Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 75, n. 2, p. 219–227, 2001.

LEE, C.; PARKIN, K. L. Comparative Fatty Acid Selectivity of Lipases in Esterification Reactions with Glycerol and Diol Analogues in Organic Media. **Biotechnology Progress**, v. 16, p. 372–377, 2000.

LI, H.; HAN, Z.; LIU, F.; LI, G.; GUO, M.; CUI, P.; ZHOU, S.; YU, M. Esterification catalyzed by an efficient solid acid synthesized from PTSA and UiO-66(Zr) for biodiesel production. **Faraday Discussions**, v. 231, n. 0, p. 342–355, 2021.

LIEBERMAN, R. B.; OLLIS, D. F. Hydrolysis of Particulate Tributyrin in a Fluidized Lipase Reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. XVII, p. 1401–1419, 1975.

LIMA-RAMOS, J.; TUFVESSON, P.; WOODLEY, J. M. Application of environmental and economic metrics to guide the development of biocatalytic processes. **Green Processing and Synthesis**, v. 3, n. 3, p. 195–213, 2014.

LIMA, L. C. D.; PERES, D. G. C.; MENDES, A. A. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 7, p. 991–1002, 2018.

LIMA, L. N. DE; MENDES, A. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TARDIOLI, P. W.; CAMARGO GIORDANO, R. DE L. Performance of different immobilized lipases in the syntheses of short- and long-chain carboxylic acid esters by esterification reactions in organic media. **Molecules**, v. 23, n. 4, 2018.

LIN, C.; MA, L. Comparison of Water-Removal Efficiency of Molecular Sieves Vibrating by Rotary Shaking and Electromagnetic Stirring from Feedstock Oil for Biofuel Production.

Fermentation, v. 7, n. 132, 2021.

LINDBERG, C.; TAN, S.; YAN, J.; STARFELT, F. Key performance indicators improve industrial performance. **Energy Procedia**, v. 75, p. 1785–1790, 2015.

LIRA, R. K. D. S. et al. Agroindustrial Wastes as a Support for the Immobilization of Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Synthesis of Hexyl Laurate. **Biomolecules**, v. 11, n. 445, p. 1–15, 2021.

LIU, M.; FU, J.; TENG, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, N.; WANG, Y. Fast Production of Diacylglycerol in a Solvent Free System via Lipase Catalyzed Esterification Using a Bubble Column Reactor. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 5, p. 637–648, 2016.

LIU, Y.; LOTERO, E.; JR, J. G. G. Effect of carbon chain length on esterification of carboxylic acids with methanol using acid catalysis. **Journal of Catalysis**, v. 243, p. 221–228, 2006.

LOKHA, Y.; ARANA-PEÑA, S.; RIOS, N. S.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; GONÇALVES, L. R. B.; LOPEZ-GALLEGO, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 133, 2020.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.; BENAIGES, M. D.; SEBASTIAN, X.; BUENO, J. M.; VALERO, F. Producing Natural Flavours from Isoamyl Alcohol and Fusel Oil by Using Immobilised *Rhizopus oryzae* Lipase. **Catalysts**, v. 12, n. 6, p. 1–13, 2022.

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

LORENZO, B.; FERNÁNDEZ, L.; ORTEGA, J.; DOMÍNGUEZ, L. Improvements in the Modeling and Kinetics Processes of the Enzymatic Synthesis of Pentyl Acetate. **Processes**, v. 11, p. 1-15, 2023.

LOTERO, E.; LIU, Y.; LOPEZ, D. E.; SUWANNAKARN, K.; BRUCE, D. A.; GOODWIN, J. G. Synthesis of Biodiesel via Acid Catalysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 5353–5363, 2005.

LOTTI, M.; PLEISS, J.; VALERO, F.; FERRER, P. Effects of methanol on lipases: Molecular, kinetic and process issues in the production of biodiesel. **Biotechnology Journal**, v. 10, p. 22–30, 2015.

LUE, B.; KARBOUNE, S.; YEBOAH, F. K.; KERMASHA, S. Lipase-catalyzed esterification of cinnamic acid and oleyl alcohol in organic solvent media. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n. July, p. 462–468, 2005.

MADE-IN-CHINA. Made-in-China.com - Manufacturers, Suppliers & Products in China. Disponível em: <<https://www.made-in-china.com/>>. Acesso em 4 de Outubro de 2024.

MADRAS, G.; KUMAR, R.; MODAK, J. Synthesis of octyl palmitate in various supercritical fluids. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 43, n. 24, p. 7697–7701, 2004.

MALCATA, F. X.; REYES, H. R.; GARCIA, H. S.; HILL, C. G.; AMUNDSONT, C. H. Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, p. 426–446, 1992.

MANGIAGALLI, M.; CATELANI, T.; AMI, D.; DIVITIIS, M. DE; NATALELLO, A.; LOTTI, M.; BROCCA, S. Short-chain alcohols inactivate an immobilized industrial lipase through two different mechanisms. **Biotechnology Journal**, v. 17, n. 6, p. 1–10, 2022.

MANOEL, E. A.; SANTOS, J. C. S. DOS; FREIRE, D. M. G.; RUEDA, N.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 1 abr. 2015.

MARÍN-SUÁREZ, M.; MÉNDEZ-MATEOS, D.; GUADIX, A.; GUADIX, E. M. Reuse of immobilized lipases in the transesterification of waste fish oil for the production of biodiesel. **Renewable Energy**, v. 140, p. 1–8, 2019.

MARINA, A. M.; CHE MAN, Y. B.; NAZIMAH, S. A. H.; AMIN, I. Chemical properties of virgin coconut oil. **JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, n. 4, p. 301–307, 2009.

MARKUS, Z.; BELAFI-BAKO, K.; TOTH, G.; NEMESTÓTHY, N.; GUBCIZA, L. Effect of Chain Length and Order of the Alcohol on Enzyme Activity during Enzymatic Esterification in Organic Media. **Hungarian Journal of Industry and Chemistry**, v. 45, n. 2, p. 35–39, 2017.

MARTINELLE, M.; HULT, K. Kinetics of acyl transfer reactions in organic media catalysed by *Candida antarctica* lipase B. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 1251, n. 2, p. 191–197, 1995.

MARTINEZ-GARCIA, M.; HECKE, W. VAN; PEETERS, H.; GABRIELS, D.; DER, P. VAN. Methyl oleate for plant protection products formulations: Enzymatic synthesis, reaction kinetics and application testing. **Journal of Biotechnology**, v. 379, n. November 2023, p. 78–86, 2024.

MARTINS, A. B.; FRIEDRICH, J. L. R.; CAVALHEIRO, J. C.; GARCIA-GALAN, C.; BARBOSA, O.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene-divinylbenzene beads. **Bioresource Technology**, v. 134, p. 417–422, 2013.

MARTINS, A. B.; GRAEBIN, N. G.; LORENZONI, A. S. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Rapid and high yields of synthesis of butyl acetate catalyzed by Novozym 435: Reaction optimization by response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2311–2316, 2011.

MARTINS, A. B.; SCHEIN, M. F.; FRIEDRICH, J. L. R.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; AYUB, M. A. Z.; RODRIGUES, R. C. Ultrasound-assisted butyl acetate synthesis catalyzed

by Novozym 435: Enhanced activity and operational stability. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1155–1160, 2013.

MARTINS, A. B.; SILVA, A. M. DA; SCHEIN, M. F.; GARCIA-GALAN, C.; ZÁCHIA AYUB, M. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Comparison of the performance of commercial immobilized lipases in the synthesis of different flavor esters. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 105, p. 18–25, 2014.

MARTY, A.; DOSSAT, V.; CONDORET, J. S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, n. 2, p. 232–237, 1997.

MEHTA, A.; GROVER, C.; BHARDWAJ, K. K.; GUPTA, R. Application of lipase purified from *Aspergillus fumigatus* in the syntheses of ethyl acetate and ethyl lactate. **Journal of Oleo Science**, v. 69, n. 1, p. 23–29, 2020.

MEHTA, A. Industry's water sustainability crisis. Disponível em: <<https://www.chemistryworld.com/features/industrys-water-sustainability-crisis/4019196.article>>. Acesso em: 09 de Setembro de 2024.

MENDES, A. A.; OLIVEIRA, P. C.; VÉLEZ, A. M.; GIORDANO, R. C.; GIORDANO, R. D. L. C.; CASTRO, H. F. DE. Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 503–511, 2012.

MENESES, A. C. DE; LERIN, L. A.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; OLIVEIRA, D. DE. Benzyl propionate synthesis by fed-batch esterification using commercial immobilized and lyophilized Cal B lipase. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, n. 10, p. 1625–1634, 2019.

MOAZENI, F.; CHEN, Y.; ZHANG, G. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of Cleaner Production**, 2019.

MOREIRA, K. DA S. et al. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: Performance in Fatty Acid Ethyl Ester (FAEE) Optimized Production by the Taguchi Method. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, n. June, p. 1–17, 2020.

MUNIANDY, M.; LASEKAN, O.; GHAZALI, H. M.; RAHMAN, M. B. A. Lipase-Catalyzed Formation of Pentyl Nonanoate using Screened Immobilized Lipase from *Rhizomucor meihei*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 03, p. 1089–1097, 2019.

NARWAL, S. K.; SAUN, N. K.; DOGRA, P.; GUPTA, R. Green synthesis of isoamyl acetate via silica immobilized novel thermophilic lipase from *Bacillus aerius*. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 69–73, 2016.

NATALINO, R.; CARDOSO, A. L.; FERNANDES, S. A. p-Sulfonic acid calix[n]arenes: the most active and water tolerant organocatalysts in esterification reactions. **Catalysis Science & Technology**, p. 1369–1375, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Principles of biochemistry**. 4th. ed. [s.l.] W.H. Freeman, 2004.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. ADSORPTION OF INVERTASE. **Journal of the American Chemical Society**, v. 38, n. 5, p. 1109–1115, 1 maio 1916.

NIELSEN, P. M.; BRASK, J.; FJERBAEK, L. Enzymatic biodiesel production: Technical and economical considerations. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 110, n. 8, p. 692–700, 2008.

NOBLE, M. E.; CLEASBY, A.; OLIVIER, L.; VLAARDINGEN, N.-A. T. The crystal structure of triacylglycerol lipase from *Pseudomonas glauae* reveals a partially redundant catalytic aspartate. **FEBS Letters**, v. 331, n. 1, p. 123–128, 1993.

NORDBLAD, M.; ADLERCREUTZ, P. Effects of acid concentration and solvent choice on enzymatic acrylation by *Candida antarctica* lipase B. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 127–133, 2008.

NORO, J.; CASTRO, T. G.; CAVACO-PAULO, A.; SILVA, C. Substrate hydrophobicity and enzyme modifiers play a major role in the activity of lipase from: *Thermomyces lanuginosus*. **Catalysis Science and Technology**, v. 10, n. 17, p. 5913–5924, 2020.

NYARI, N.; PAULAZZI, A.; ZAMADEI, R.; STEFFENS, C.; ZABOT, G. L.; TRES, M. V.; ZENI, J.; VENQUIARUTO, L.; DALLAGO, R. M. Synthesis of isoamyl acetate by ultrasonic system using *Candida antarctica* lipase B immobilized in polyurethane. **Journal of Food Process Engineering**, v. 41, n. 6, 2018.

OGNJANOVIC, N.; BEZBRADICA, D.; KNEZEVIC-JUGOVIC, Z. Enzymatic conversion of sunflower oil to biodiesel in a solvent-free system: Process optimization and the immobilized system stability. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 21, p. 5146–5154, 2009.

OGUNDERO, V. W. Partial purification and activities of extracellular lipase of *Thermomyces lanuginosus* from Nigerian palm produce. **Mycopathologia**, v. 109, p. 105–109, 1987.

OLIVEIRA, A. C.; ROSA, M. F.; AIRES-BARROS, M. R.; CABRAL, J. M. S. Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid - A kinetic study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4–6, p. 999–1005, 2001.

OLIVEIRA, T. P. DE; PEREIRA, M.; SANTOS, F. Incorporation of metallic particles in activated carbon used in lipase immobilization for production of isoamyl acetate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 97, n. 7, p. 1736–1746, 2022.

OLIVEIRA, U. M. F. DE; LIMA DE MATOS, L. J. B.; SOUZA, M. C. M. DE; PINHEIRO, B. B.; SANTOS, J. C. S. DOS; GONÇALVES, L. R. B. Efficient biotechnological synthesis of flavor esters using a low-cost biocatalyst with immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. **Molecular Biology Reports**, v. 46, n. 1, p. 597–608, 2019.

OLLIS, D. L. et al. The α/β hydrolase fold. **Protein Engineering**, v. 5, n. 3, p. 197–211, 1992.

OMPI – Pesquisa nas coleções internacionais e nacionais de patentes. Disponível em: <<https://patentscope.wipo.int/search/pt/search.jsf>>. Acesso em 21 de Agosto de 2024.

ORTEGA-REQUENA, S.; MONTIEL, C.; FUENSANTA, M.; BASTIDA, J. Esters in the Food and Cosmetic Industries: An Overview of the Reactors Used in Their Biocatalytic Synthesis. **Materials**, 17, p. 1-30, 2024.

ORTIZ, C.; FERREIRA, M. L.; BARBOSA, O.; SANTOS, J. C. S. DOS; RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; BRIAND, L. E.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? **Catalysis Science and Technology**, v. 9, n. 10, p. 2380–2420, 2019.

PAIVA, A. L.; BALCÃO, V. M.; MALCATA, F. X. Kinetic and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 1, p. 187–204, 2000.

PALUDO, N.; ALVES, J. S.; ALTMANN, C.; AYUB, M. A. Z.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. The combined use of ultrasound and molecular sieves improves the synthesis of ethyl butyrate catalyzed by immobilized *Thermomyces lanuginosus* lipase. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 22, p. 89–94, 2014.

PARIKH, D. T.; LANJEKAR, K. J.; RATHOD, V. K. Kinetics and thermodynamics of lipase catalysed synthesis of propyl caprate. **Biotechnology Letters**, v. 41, n. 10, p. 1163–1175, 2019.

PARK, J.; PARK, K. Lipase and Its Unique Selectivity: A Mini-Review. **Journal of Chemistry**, v. 2022, p. 1–11, 2022.

PATTI, S.; ALUNNO, M.; PEDRONI, S.; RIVA, S.; FERRANDI, E.; MONTI, D. Advances and Challenges in the Development of Immobilized Enzymes for Batch and Flow Biocatalyzed Processes. **ChemSusChem**, v. 18, n. 8, p. 1–16, 2024.

PEREIRA, G. N.; HOLZ, J. P.; GIOVANNINI, P. P.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. DE; LERIN, L. A. Enzymatic esterification for the synthesis of butyl stearate and ethyl stearate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 16, n. September, p. 373–377, 2018.

PERSSON, M.; MLADENOSKA, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833–841, 2002.

PETERS, G. H.; BYWATER, R. P. Computational analysis of chain flexibility and fluctuations in Rhizomucor miehei lipase. **Protein Engineering**, v. 12, n. 9, p. 747–754, 1999.

PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1, p. 67–80, 1998.

Pochteca Coremal - Distribuidora de Produtos Químicos. Disponível em: <<https://brasil.pochteca.net/>>. Acesso em 4 de Outubro de 2024.

POOVAN, F.; CHANDRASHEKHAR, V. G.; NATTE, K.; JAGADEESH, R. V. Synergy between homogeneous and heterogeneous catalysis. **Catalysis Science & Technology**, v. 12, n. 22, p. 6623–6649, 2022.

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

Portal Periódicos CAPES. Disponível em: <<https://www-webofscience-com.ez106.periodicos.capes.gov.br/wos/woscc/basic-search>>. Acesso em: 15 de Dezembro de 2024.

Produtos Químicos - CETESB. Disponível em: <<https://produtosquimicos.cetesb.sp.gov.br/Ficha>>. Acesso em: 11 de Novembro de 2024

PUBCHEM. PubChem. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 25 de Setembro de 2024.

QUAGLIA, D.; ALEJALDRE, L.; OUADHI, S.; ROUSSEAU, O.; PELLETIER, J. N. Holistic engineering of Cal-A lipase chain- length selectivity identifies triglyceride binding hot-spot. **PLoS ONE**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2019.

QURESHI, N. Chapter 5 - Integrated Processes for Product Recovery. In: QURESHI, N.; HODGE, D. B.; VERTÈS, A. A. B. T.-B. (Eds.). In: **Biorefineries Integrated Biochemical Processes for Liquid Biofuels**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 101–118.

RAHMAN, I. N. A.; MANAN, F. M. A.; MARZUKI, N. H. C.; MAHAT, N. A.; ATTAN, N.; KEYON, A. S. A.; JAMALIS, J.; ABOUL-ENEIN, H. Y.; WAHAB, R. A. A statistical approach for optimizing the high yield green production of the flavor ester butyl butyrate. **Jurnal Teknologi**, v. 79, n. 7, p. 141–151, 2017.

RANGHEARD, M.; TRIANTAPHYLIDES, G. L. C.; BARATTI, J. Multi-competitive enzymatic reactions in organic media: a simple test for the determination of lipase fatty acid specificity. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1004, p. 20–28, 1989.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; SIMPELKAMP, J. Efficient immobilization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials. **Biotechnology and bioengineering**, v. 49, n. 5, p. 527–534, mar. 1996.

RICHARDSON, J. T. **Principles of Catalyst Development**. 1. ed. New York: Springer Science and Business Media LLC, 1989.

RICHETTI, A.; LEITE, S. G. F.; ANTUNES, O. A. C.; SOUZA, A. L. F. DE. Optimization of 2-ethylhexyl Palmitate Production Using Lipozyme RM IM as Catalyst in a Solvent-Free System. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2498–2508, 2010.

RIOS, N. S.; MENDEZ-SANCHEZ, C.; ARANA-PENÑA, S.; RUEDA, N.; ORTIZ, C.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipase from *Pseudomonas fluorescens* on glyoxyl-octyl-agarose beads: Improved stability and reusability. **Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics**, v. 1867, n. 9, p. 741–747, set.

2019.

ROBINSON, P. K. Enzymes: principles and biotechnological applications. **Essays in Biochemistry**, v. 59, p. 1–41, 2015.

ROCHA, J. M. S.; GIL, M. H.; GARCIA, F. A. P. Optimisation of the enzymatic synthesis of n-octyl oleate with immobilised lipase in the absence of solvents. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 74, n. 7, p. 607–612, 1999.

RODRIGUES, R. C.; AYUB, M. A. Z. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682–688, 2011.

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

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C.; PESSELA, B. C. C.; VOLPATO, G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M.; AYUB, M. A. Z. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized – stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268–1273, 2010.

RODRIGUES, R. C.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; SANTOS, J. C. S. DOS; BERENGUER-MURCIA, Á.; ALCANTARA, A. R.; BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

ROLLBUSCH, P.; BOTHE, M.; BECKER, M.; LUDWIG, M.; GRÜNEWALD, M.; SCHLÜTER, M.; FRANKE, R. Bubble columns operated under industrially relevant conditions – Current understanding of design parameters. **Chemical Engineering Science**, v. 126, p. 660–678, 2015.

ROMERO, M. D.; CALVO, L.; ALBA, C.; DANESHFAR, A.; GHAZIASKAR, H. S. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in *n*-hexane. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 42–48, 2005.

ROSELL, C. M.; TERRENI, M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUIBAN, J. M. A criterion for the selection of monophasic solvents for enzymatic synthesis. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 1–2, p. 64–69, 1998.

ROSSET, I. G.; CAVALHEIRO, M. C. H. T.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Enzymatic Esterification of Oleic Acid with Aliphatic Alcohols for the Biodiesel Production by *Candida antarctica* Lipase. **Catalysis Letters**, v. 143, n. 9, p. 863–872, 2013.

RUPLEY, J. A.; CARERI, G. Protein hydration and function. **Advances in protein**

chemistry, v. 41, p. 37–172, 1991.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C. DE; ARAÚJO, P. H. H. DE; OLIVEIRA, D. DE. A review on enzymatic synthesis of aromatic esters used as flavor ingredients for food, cosmetics and pharmaceuticals industries. **Trends in Food Science and Technology**, v. 69, p. 95–105, 2017.

SÁ, A. G. A.; MENESES, A. C. DE; LERIN, L. A.; ARAÚJO, P. H. H. DE; SAYER, C.; OLIVEIRA, D. DE. Biocatalysis of aromatic benzyl-propionate ester by different immobilized lipases. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 5, p. 585–591, 2018.

SAKAI, T.; KAWASHIMA, A.; KOSHIKAWA, T. Economic assessment of batch biodiesel production processes using homogeneous and heterogeneous alkali catalysts. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3268–3276, 2009.

SALAH, R. BEN; GHAMGHUI, H.; MILED, N.; MEJDOUB, H.; GARGOURI, Y. Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 103, n. 4, p. 368–372, 2007.

SANDOVAL, G. C.; MARTY, A.; CONDORET, J. S. Thermodynamic Activity-Based Enzyme Kinetics: Efficient Tool for Nonaqueous Enzymology. **AIChE Journal**, v. 47, n. 3, p. 718–726, 2001.

SANDOVAL, G.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Esterification by Immobilized Lipase in Solvent-Free Media: Kinetic and Thermodynamic Arguments. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 78, n. 3, p. 313–320, 2002.

SANTOS, J. C.; BUENO, T.; RÓS, P. C. M.; CASTRO, H. F. DE. Lipase-catalyzed Synthesis of Butyl Esters by Direct Esterification in Solvent-Free System. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, p. 956–961, 2007.

SANTOS, J. C. S. DOS; RUEDA, N.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Tuning the catalytic properties of lipases immobilized on divinylsulfone activated agarose by altering its nanoenvironment. **Enzyme and microbial technology**, v. 77, p. 1–7, set. 2015.

SANTOS, J. C. S. DOS; RUEDA, N.; SANCHEZ, A.; VILLALONGA, R.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015.

Scanview Application 2025. Disponível em: <<https://community.agilent.com/technical/consumables/m/files/1525>>. Acesso em: 15 de Janeiro de 2025.

SCHMITT, J.; BROCCA, S.; SCHMID, R. D.; PLEISS, J. Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. **Protein Engineering**, v. 15, n. 7, p. 595–601, 2002.

SCHÖNFELD, P.; WOJTCZAK, L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. **Journal of Lipid Research**, v. 57, p. 943–954, 2016.

SCHRAG, J. D. et al. The open conformation of a *Pseudomonas* lipase. **Structure**, v. 5, n. 2, p. 187–202, 1997.

SEADER. **Separation Process Principles**. 3. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Ltd, 2011.

SELMİ, B.; GONTIER, E.; ERGAN, F.; THOMAS, D. Effects of fatty acid chain length and unsaturation number on triglyceride synthesis catalyzed by immobilized lipase in solvent-free medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 23, n. 98, p. 182–186, 1998.

SEO, J.; SHIN, M.; LEE, J.; LEE, T.; OH, J. M.; PARK, C. Novel and highly efficient lipase-catalyzed esterification of formic acid with hexanol for waste gas reutilization. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 93, p. 430–435, 2021.

SERRANO-ARNALDOS, M.; BASTIDA, J.; MÁXIMO, F.; ORTEGA-REQUENA, S.; MONTIEL, C. One-Step Solvent-Free Production of a Spermaceti Analogue Using Commercial Immobilized Lipases. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 2, p. 748–752, 2018.

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

SERRANO-ARNALDOS, M.; MURCIA, M. D.; ORTEGA-REQUENA, S.; MONTIEL, M. C.; MÁXIMO, F.; GÓMEZ, E.; BASTIDA, J. A simplified kinetic model to describe the solvent-free enzymatic synthesis of wax esters. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. December 2020, p. 2325–2335, 2021.

SERRANO-ARNALDOS, M.; ORTEGA-REQUENA, S.; MONTIEL, M. C.; MÁXIMO, F.; BASTIDA, J.; MURCIA, M. D. Preliminary economic assessment: a valuable tool to establish biocatalytic process feasibility with an in-lab immobilized lipase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 409–417, 2019.

SÉVERAC, E.; GALY, O.; TURON, F.; PANTEL, C. A.; CONDORET, J. S.; MONSAN, P.; MARTY, A. Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 1, p. 61–70, 2011.

SHARMA, S.; KUMAR, S.; SAHNEY, R.; DAHIYA, P. Green synthesis of iron-alginate nanoparticle for Taguchi-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase and its application in the synthesis of butyl butyrate ester. **Process Biochemistry**, v. 139, n. September 2023, p. 81–92, 2024.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, p. 1289–1307, 2007.

SHELDON, R. A. Green and sustainable manufacture of chemicals from biomass: state of the art. **Green Chemistry**, v. 16, p. 950–963, 2014.

SHELDON, R. A.; PELT, S. VAN. Enzyme immobilisation in biocatalysis: Why, what and how. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–6235, 2013.

SHELDON, R. A.; WOODLEY, J. M. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. **Chemical Reviews**, v. 118, n. 2, p. 801–838, 2018.

SHIN, J.; SEO, J. Directed Evolution of Lipase to Have Enhanced Activity toward Short Chain Fatty Acids and Elucidation of Structural Features of Mutant. **Korean Society for Biotechnology and Bioengineering Journal**, v. 38, n. 1, p. 21–27, 2023.

SHREVE, R. N.; BRINKS, J. A. **Indústrias de Processos Químicos**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977.

SHUAI, W.; DAS, R. K.; NAGHDI, M.; BRAR, S. K.; VERMA, M. A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 64, n. 4, p. 496–508, 2017.

SHUHAN, L.; YAMEI, S.; XIUQIN, D.; YINGZHE, Y. Design and Control of Ethyl Acetate – Ethanol Separation via Pressure-Swing Distillation. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, v. 57, n. 5, p. 917–932, 2023.

Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products and services. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/>>. Acesso em 4 de Outubro de 2024.

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

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

SJÖBLOM, M.; RISBERG, P.; FILIPPOVA, A.; ÖHRMAN, O. G. W.; ROVA, U.; CHRISTAKOPOULOS, P. In Situ Biocatalytic Synthesis of Butyl Butyrate in Diesel and Engine Evaluations. **ChemCatChem**, v. 9, n. 24, p. 4529–4537, 2017.

SKORONSKI, E.; PADOIN, N.; SOARES, C.; FURIGO, A. Stability of immobilized *Rhizomucor miehei* lipase for the synthesis of pentyl octanoate in a continuous packed bed bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, n. 3, p. 633–641, 2014.

SOARES, C. M.; CASTRO, H. F. DE; MORAES, F. F. DE; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* lipase immobilized on controlled pore silica. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 77–79, p. 745–757, 1999.

SOLAESA, Á. G.; TERESA, M.; FALKEBORG, M.; BELTRÁN, S.; GUO, Z. Production and concentration of monoacylglycerols rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids by enzymatic glycerolysis and molecular distillation. **Food Chemistry**, v. 190, p. 960–967, 2016.

SOSE, M. T.; BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Solvent free lipase catalyzed synthesis of butyl caprylate. **Journal of Chemical Sciences**, v. 129, n. 11, p. 1755–1760, 2017.

SOUSA, R. R.; COSTA, MARTINA; PINTO, C.; et al. Comparative performance and reusability studies of lipases on syntheses of octyl esters with an economic approach. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 45, n. 1, p. 131–145, 2021.

SOUSA, R. R.; CASTRO, R. DE P. V.; ASSIS, N. M.; SILVA, A. S.; FREIRE, D. M. G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Technical–Economic Assessment—The Missing Piece for Increasing the Attractiveness of Applied Biocatalysis in Ester Syntheses? **Catalysts**, v. 13, n. 2, 2023.

SOUSA, R. R.; LÁZARO, C. DA C.; GOMES, C. B. DE S. M. R.; SILVA, A. S. A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Butyl-esters synthesis from palm fatty acid distillate catalyzed by immobilized lipases in solvent-free system – Optimization using a simplified method (SER). **Process Biochemistry**, v. 128, n. January, p. 158–166, 2023.

SOUSA, R. R.; PAZUTTI, L. V. B.; DALMASO, G. Z. L.; SIQUEIRA, D. F.; SILVA, A. S.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. A practical approach to obtain high yield lipase-mediated synthesis of octyl caprylate with Novozym 435. **Biocatalysis and Biotransformation**, 2020.

SOUSA, R. R.; SILVA, A. S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetics perspective. **Catalysis Science & Technology**, v. 11, p. 5696–5711, 2021.

SOUSA, R. R.; SILVA, AYLÁ SANT'ANA; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; FERREIRA-LEITÃO, V. S. Simplified method to optimize enzymatic esters syntheses in solvent-free systems: Validation using literature and experimental data. **Catalysts**, v. 11, n. 11, 2021.

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

STRAATHOF, A. J. J. Transformation of biomass into commodity chemicals using enzymes or cells. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 3, p. 1871–1908, 2014.

SUAREZ, P. A. Z.; MENEGHETTI, S. M. P. Parâmetros Físico-Químicos para os Processos de Produção de Biodiesel. 1. ed. Brasília: Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações - MCTI, 2015.

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

SVENSSON, I.; WEHTJE, E.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. Effects of Water Activity on Reaction Enzymatic Esterifications. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 44, p. 549–556, 1994.

SZCZESNA ANTCHAK, M.; KUBIAK, A.; ANTCHAK, T.; BIELECKI, S. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185–1194, 2009.

TABATABAEI, M.; AGHBASHLO, M.; DEHHAGHI, M.; SOUFIYAN, M. M. Reactor technologies for biodiesel production and processing: A review. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 74, p. 239–303, 2019.

TACIAS-PASCACIO, V. G.; VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; JIMÉNEZ-PÉREZ, M.; YATES, M.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support. **Fuel**, v. 200, p. 1–10, 2017.

TAHER, H.; GIWA, A.; ABUSABIEKEH, H.; AL-ZUHAIR, S. Biodiesel production from *Nannochloropsis gaditana* using supercritical CO₂ for lipid extraction and immobilized lipase transesterification: Economic and environmental impact assessments. **Fuel Processing Technology**, v. 198, n. July 2019, p. 106249, 2020.

TAKÓ, M.; KOTOGÁN, A.; PAPP, T.; KADAIKUNAN, S.; ALHARBI, N. S.; VAGVOLGYI, C. Purification and Properties of Extracellular Lipases with Transesterification Activity and 1,3-Regioselectivity from *Rhizomucor miehei* and *Rhizopus oryzae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, n. 2, p. 277–288, 2017.

TASSEL, L. VAN; MOILANEN, A.; RUDDOCK, L. W. Efficient production of wild-type lipase B from *Candida antarctica* in the cytoplasm of *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 165, n. June 2019, p. 105498, 2020.

THUM, O.; OXENBØLL, K. M. Biocatalysis – A Sustainable Method for the Production of Emollient Esters. **SÖFW-Journal**, v. 134, n. 1, 2008a.

TODERO, L. M.; BASSI, J. J.; LAGE, F. A. P.; CORRADINI, M. C. C.; BARBOZA, J. C. S.; HIRATA, D. B.; MENDES, A. A. Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 8, 2015.

TOWLER, G.; SINNOTT, R. **Chemical Engineering Design - Principles, Practice and Economics of Plant and Process Design**. 2. ed. Oxford: Elsevier Ltd., 2013.

TUFVESSON, P.; FU, W.; JENSEN, J. S.; WOODLEY, J. M. Process considerations for the scale up and implementation of biocatalysis. **Food and Bioprocess Technology**, v. 88, p. 3–11, 2010.

TUFVESSON, P.; LIMA-RAMOS, J.; NORDBLAD, M.; WOODLEY, J. M. Guidelines and cost analysis for catalyst production in biocatalytic processes. **Organic Process Research and Development**, v. 15, n. 1, p. 266–274, 2011.

TUFVESSON, P.; TÖRNVALL, U.; CARVALHO, J.; KARLSSON, A. J.; HATTI-KAUL, R. Towards a cost-effective immobilized lipase for the synthesis of specialty chemicals. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 200–205, 2011.

TURTON, R.; SHAEIWITZ, J.; BHATTACHARYYA, D.; WHITING, W. B. **Analysis, Synthesis, and Design of Chemical Processes**. 5. ed. Boston: Pearson Education, 2018.

UPPENBERG, J.; HANSEN, M. T.; PATKAR, S.; JONES, T. A. The sequence, crystal

structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, p. 293–308, 1994.

US INFLATION CALCULATOR. US Inflation Calculator. Disponível em: <<https://www.usinflationcalculator.com/>>. Acesso em 10 de Outubro de 2024.

USSEGLIO, M.; SALVADORI, V.; SIRI, G. Advanced modeling of vegetable oils steam stripping with structured packing columns. **Computers & Chemical Engineering**, v. 121, p. 654–669, 2019.

VADGAMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI, A. M. Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I: Batch optimization studies. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 133–137, 2015.

VALIVETY, R. H.; HALLING, P. J.; PEILOW, A. D.; MACRAE, A. R. Lipases from different sources vary widely in dependence of catalytic activity on water activity. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1122, n. 2, p. 143–146, jul. 1992.

VALIVETY, R. H.; JOHNSTON, G. A.; SUCKLING, C. J.; HALLING, P. J. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 10, p. 1137–1143, 1991.

VARMA, M. N.; MADRAS, G. Effect of chain length of alcohol on the lipase-catalyzed esterification of propionic acid in supercritical carbon dioxide. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 8, p. 2342–2354, 2010.

VAYSSE, L.; LY, A.; MOULIN, G.; DUBREUCQ, E. Chain-length selectivity of various lipases during hydrolysis, esterification and alcoholysis in biphasic aqueous medium. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, n. 5, p. 648–655, 2002.

VERGER, R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. **Trends in Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 32–38, 1997.

VILLALBA, M.; VERDASCO-MARTÍN, C. M.; SANTOS, J. C. S. DOS; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; OTERO, C. Operational stabilities of different chemical derivatives of Novozym 435 in an alcoholysis reaction. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 90, p. 35–44, 2016.

VIRGEN-ORTÍZ, J. J.; TACIAS-PASCACIO, V. G.; HIRATA, D. B.; TORRESTIANA-SANCHEZ, B.; ROSALES-QUINTERO, A.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 96, p. 30–35, 2017.

WAGHORNE, W. E. A Study of Kamlet–Taft β and π^* Scales of Solvent Basicity and Polarity/Polarizability Using Computationally Derived Molecular Properties. **Journal of Solution Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 466–485, 2020.

WAKEMAN, R. J. LIQUID-SOLID SEPARATION. Disponível em: <<https://www.thermopedia.com/content/928/>>. Acesso em 04 de Fevereiro de 2025.

WANG, M.; JIANG, H. Reaction-controlled recovery of the copper(II) methanesulfonate catalyst for esterification. **Reaction Kinetics and Catalysis Letters**, v. 84, n. 2, p. 223–228, 2005.

WATANABE, T.; SHIMIZU, M.; SUGIURA, M.; SATO, M.; KOHORI, J.; YAMADA, N.; NAKANISHI, K. Optimization of Reaction Conditions for the Production of DAG Using Immobilized 1,3-Regiospecific Lipase Lipozyme RM IM. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 12, p. 1201–1207, 2003.

WEIMER, A. W. **Carbide, Nitride and Boride Materials Synthesis and Processing**. 1. ed. Londres: Chapman and Hall/CRC, 1997.

WIEMANN, L. O.; NIEGUTH, R.; ECKSTEIN, M.; NAUMANN, M.; THUM, O.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Composite Particles of Novozyme 435 and Silicone: Advancing Technical Applicability of Macroporous Enzyme Carriers. **ChemCatChem**, v. 1, n. 4, p. 455–462, 7 dez. 2009.

WIERSCHEM, M.; SCHLIMPER, S.; HEILS, R.; SMIRNOVA, I.; KISS, A. A.; SKIBOROWSKI, M.; LUTZE, P. Pilot-scale validation of Enzymatic Reactive Distillation for butyl butyrate production. **Chemical Engineering Journal**, v. 312, p. 106–117, 2017.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 259–264, 2006.

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

WOODLEY, J. M. Accelerating the implementation of biocatalysis in industry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, p. 4733–4739, 2019.

WOODLEY, J. M. Ensuring the Sustainability of Biocatalysis. **ChemSusChem**, v. 15, p. 1–4, 2022.

WOODLEY, J. M.; TITCHENER-HOOKER, N. J. The use of windows of operation as a bioprocess design tool. **Bioprocess Engineering**, v. 14, n. 5, p. 263–268, 1996.

World of Aromas. Disponível em: <<https://worldofaromas.com/>>. Acesso em: 4 de Outubro de 2024.

XU, Y. Process Technology for Immobilized Lipase-Catalyzed Reactions. [s.l.] DTU - Technical University of Denmark, 2013.

YADAV, G. D.; THORAT, P. A. Microwave assisted lipase catalyzed synthesis of isoamyl myristate in solvent-free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 83, p. 16–22, 2012.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M.; SP, C. A. L.; SP, C. A. L.; SP, C. A. L.; SP, C. A. L. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 0229, n. April, p. 438–450, 1998.

YANG, J.; ZHOU, M.; WANG, Y.; ZHANG, X.; WU, G. Simulation of Pressure-swing Distillation for Separation of Ethyl Acetate-Ethanol-Water. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 274, 2017.

YOUSSEF, A. A.; AL-DAHMAN, M. H.; DUDUKOVIC, M. P. Bubble columns with internals: A review. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 11, n. 1, p. 169–223, 2013.

YU, H.; LEE, M.; SHIN, H.; PARK, K.; CHANG, P. Lipase-catalyzed solvent-free synthesis of erythorbyl laurate in a gas-solid-liquid multiphase system. **Food Chemistry**, v. 271, n. July 2018, p. 445–449, 2019.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 82, n. 10, p. 3192–3196.

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

ZANG, Y.; SHI, J.; ZHANG, F.; ZHONG, Y.; ZHU, W. Sulfonic acid-functionalized MIL-101 as a highly recyclable catalyst for esterification. **Catalysis Science and Technology**, v. 3, n. 8, p. 2044–2049, 2013.

ZHANG, C.; LIANG, X.; ABDO, A. A. A.; KADDOUR, B.; LI, X.; TENG, C.; WAN, C. Ultrasound-assisted lipase-catalyzed synthesis of ethyl acetate: process optimization and kinetic study. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 35, n. 1, p. 255–263, 2021.

ZHANG, S.; GUO, F.; YAN, W.; DONG, W.; ZHOU, J.; ZHANG, W.; XIN, F.; JIANG, M. Perspectives for the microbial production of ethyl acetate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 104, p. 7239–7245, 2020.

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

ZUCCA, P.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; SANJUST, E. Agarose and Its Derivatives as Supports for Enzyme Immobilization. **Molecules**, v. 21, p. 1–25, 2016.

10 ANEXOS

Produção Bibliográfica/Patentária no período Agosto 2021 – Julho 2025

- 1) Patente depositada: Processo de obtenção de ésteres por via enzimática em sistema multicompetitivo e meio sem solvente.

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 33663683000116

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Antônio Barros de Castro, nº 119

Cidade: Rio de Janeiro

Estado: RJ

CEP: 21941-853

País: BRASIL

Telefone:

Fax:

Email: propriedadeintelectual@inovacao.ufrj.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE ÉSTERES POR VIA ENZIMÁTICA EM SISTEMA MULTICOMPETITIVO E MEIO SEM SOLVENTE

Resumo: A presente invenção fornece um processo enzimático para a obtenção simultânea de ésteres de cadeia curta, média e longa, sem o uso de solventes. O processo utiliza lipases imobilizadas como biocatalisadores, superando a baixa especificidade dos catalisadores convencionais e resultando em ésteres mais puros e obtidos em condições brandas. Ainda, é utilizado um sistema reacional multicompetitivo, onde ácidos e álcoois de diferentes tamanhos de cadeia (curta, média e longa) reagem simultaneamente, sem a necessidade de solventes. A tecnologia torna o processo mais viável economicamente, gerando uma mistura separável de ésteres úteis para diversos setores industriais, eliminando as limitações de custo e produtividade associadas ao uso da via enzimática em sistema com solvente. Consequentemente aumentando a sustentabilidade do processo.

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 13/05/2025 às 14:25, Petição 870250038808

2) Artigo: *Comparative Performance and Reusability Studies of Lipases on Synthesis of Octyl Esters with an Economic Approach* (Bioprocess and Biosystems Engineering, Springer, 2021)

Bioprocess and Biosystems Engineering
https://doi.org/10.1007/s00449-021-02646-z

RESEARCH PAPER



Comparative performance and reusability studies of lipases on syntheses of octyl esters with an economic approach

Ronaldo Rodrigues de Sousa^{1,3} · Martina Costa Cerqueira Pinto^{2,3} · Erika Cristina Gonçalves Aguiaras^{3,4} · Eliane Pereira Cipolatti^{3,5} · Evelin Andrade Manoel⁵ · Ayla Sant'Ana da Silva^{1,3} · José Carlos Pinto² · Denise Maria Guimarães Freire³ · Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{1,3}

Received: 16 June 2021 / Accepted: 24 September 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

A suitable immobilized lipase for esters syntheses should be selected considering not only its cost. We evaluated five biocatalysts in syntheses of octyl caprylate, octyl caprate, and octyl laurate, in which conversions higher than 90% were achieved. Novozym[®] 435 and non-commercial preparations (including a dry fermented solid) were selected for short-term octyl laurate syntheses using different biocatalysts loadings. By increasing the biocatalyst's loading the lipase's reusability also raised, but without strict proportionality, which resulted in a convergence between the lowest biocatalyst loading and the lowest cost per batch. The use of a dry fermented solid was cost-effective, even using loadings as high as 20.0% wt/wt due to its low obtaining cost, although exhibiting low productiveness. The combination of biocatalyst's cost, esterification activity, stability, and reusability represents proper criteria for the choice. This kind of assessment may help to establish quantitative goals to improve or to develop new biocatalysts.

Keywords Lipases · Emollients · Enzymes immobilization · Octyl esters · Economic assessment

Introduction

The advantages of biocatalysis applied to esters production include consuming less energy, reducing environmental impacts, and improving the quality of the products, compared to conventional esters syntheses due to the high

specificity of enzymes [1, 2]. In immobilized forms, biocatalytic processes present a heterogeneous catalysis rationale, which means that the enzymes can be easily separated from the medium after reaction and reused [3–5]. Additionally, some enzymatic properties may be improved by the immobilization process, such as activity, selectivity, stability,

✉ Viridiana Santana Ferreira-Leitão
viridiana.leitao@int.gov.br

Ronaldo Rodrigues de Sousa
ronaldo.rodrigues@int.gov.br

Martina Costa Cerqueira Pinto
mpinto@peq.coppe.ufrj.br

Erika Cristina Gonçalves Aguiaras
erikaaguiaras@gmail.com

Eliane Pereira Cipolatti
eliane.cipolatti@gmail.com

Evelin Andrade Manoel
biorecados@gmail.com


Ayla Sant'Ana da Silva
ayla.santana@int.gov.br


José Carlos Pinto
pinto@peq.coppe.ufrj.br

Denise Maria Guimarães Freire
freire@iq.ufrj.br

- ¹ Biocatalysis Laboratory, Ministry of Science, Technology, and Innovations, National Institute of Technology, Rio de Janeiro, RJ 20081-312, Brazil
- ² Federal University of Rio de Janeiro, Chemical Engineering Program, COPPE, Rio de Janeiro, RJ 21941-972, Brazil
- ³ Department of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-909, Brazil
- ⁴ Federal University of Rio de Janeiro Campus, UFRJ - Duque de Caxias, Prof. Geraldo Cidade, Duque de Caxias, RJ 25240-005, Brazil
- ⁵ Pharmaceutical Biotechnology Program, Faculty of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-972, Brazil


- 3) Artigo: *Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives* (Catalysis Science and Technology, 2021, RSC)





MINI REVIEW

[View Article Online](#)
[View Journal](#)

 Check for updates

DOI: 10.1039/d1cy00699g

Received 19th April 2021
Accepted 6th July 2021

DOI: 10.1039/d1cy00699g

rsos.royalsocietypublishing.org

Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives

Ronaldo Rodrigues Sousa,^a Ayla Sant'Ana Silva,^{ab}
Roberto Fernandez-Lafuente^{c,d} and Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{d,*}

Esters are a highly relevant class of compounds in the industrial context, and biocatalysis applied to ester syntheses is already a reality for some chemical companies. Their syntheses in solvent-free systems using immobilized lipases show many economic and environmental advantages. However, considering the complexity and the variety of the simultaneous phenomena involved, the optimization of reactions in these systems is challenging. In a solvent-free system, the molar ratio of the reagents is of utmost importance, defining the behavior of the reaction medium in terms of polarity, mutual solubility, and water activity. Furthermore, the molar ratio of reagents determines the environment in which the immobilized lipase will act, and the intensity of its influence depends on the biocatalyst loading. The variation of the molar ratio and biocatalyst loading, essential parameters to be determined in an optimization study, will significantly impact the thermodynamics and kinetics of the synthesis. In this context, this review intends to show the most relevant aspects for solvent-free enzymatic esterification from thermodynamic and kinetic perspectives.

Introduction

Esters have a wide range of applications in day-by-day products. Esters of short-chain carboxylic acids, aliphatic esters, are applied as fragrance and flavors in food, cosmetic, and pharmaceutical products; esters of mid or long-chain aliphatic carboxylic acids are primarily used as emollients, surfactants, and emulsifiers in many kinds of products; long-chain esters find application as biofuels, biolubricants, and bioplastics.^{1–7} Their relevance lies not only in the diversity of structures and applications but also in the current world market as well as the projections of their growth.^{7,8,9}

Currently, at the industrial level, esters are generally produced using chemical catalysts, like mineral acids or metals that lack good selectivity, requiring harsh reaction conditions and complex downstream operations for purification of the product.^{9,10} Biocatalysis emerges as an alternative to improve the product quality due to superior

selectivity and specificity and mild reaction conditions where they can perform their function.^{9,11} For ester synthesis, a particular class of hydrolytic enzymes, lipases (triacylglycerol ester hydrolases EC 3.1.1.1), is usually adopted.^{9,12–14} Considering their stability, broad specificity, and versatility, lipases (in many instances in an immobilized form) are among the most studied biocatalysts in applications for esterification reactions.^{12,14–16} However, the high cost of biocatalysis and their low activity compared to chemical catalysts are the major drawbacks to be solved for a broad application of biocatalysis in these processes.¹⁷ In this sense, reaction conditions that promote high yield and reaction rate with a minimum quantity of biocatalyst need to be set for the industrial use of biocatalysts.

Despite the high price of commercial enzymes, important chemical companies such as BASF, Evonik, Croda, or Eastman have been offering products obtained by enzymatic catalysis in their portfolio.^{5,12} It is expected that the growing market for esters and the search for more sustainable forms of production in agreement with the need for safer and higher quality products will increase ester industrial production by enzymatic catalysis in the following years.¹⁸ The global ester market was valued at USD 1 billion in 2019 and is estimated to reach USD 3 billion by 2027.¹⁹ In 2018, the global market of industrial enzymes was estimated at USD 5.5 billion with a compound annual growth rate (CAGR) of 4.9%,^{6,20} indicating a convergence between the growth of both markets.

^a Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology, and Innovation, 20085-210, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
E-mail: viridiana.leitao@tecn.gov.br

^b Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, 21961-400, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Biocatalysis Department, ICHC-CSIC, Campus UAM-CSIC, Madrid 28049, Spain.
E-mail: rlf@ictp.csic.es

^d Center of Excellence in Biotechnology Research, National Scientific Advisory Academic, King Abdulaziz University, Jeddah 21586, Saudi Arabia

4) Artigo: *Simplified Method to Optimize Enzymatic Esters Syntheses in Solvent-Free Systems: Validation using Literature and Experimental Data* (Catalysts, 2021, MDPI)



catalysts



Article

Simplified Method to Optimize Enzymatic Esters Syntheses in Solvent-Free Systems: Validation Using Literature and Experimental Data

Ronaldo Rodrigues de Sousa ^{1,2}, Ayla Sant'Ana da Silva ^{1,2}, Roberto Fernandez-Lafuente ^{3,4,*} and Viridiana Santana Ferreira-Leitão ^{1,2,*}

- ¹ Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology, and Innovations, Rio de Janeiro 20081-312, Brazil; ronaldo.rodrigues@int.gov.br (R.R.d.S.); ayla.santana@int.gov.br (A.S.d.S.)
² Department of Biochemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil
³ Biocatalysis Department, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain
⁴ Center of Excellence in Bionanoscience Research, External Scientific Advisory Academics, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Saudi Arabia
 * Correspondence: rrl@icp.csic.es (R.F.-L.); viridiana.leitao@int.gov.br (V.S.F.-L.)



Citation: Sousa, R.R.d.; Silva, A.S.d.; Fernandez-Lafuente, R.; Ferreira-Leitão, V.S. Simplified Method to Optimize Enzymatic Esters Syntheses in Solvent-Free Systems: Validation Using Literature and Experimental Data. *Catalysts* **2021**, *11*, 1357. <https://doi.org/10.3390/catal11111357>

Academic Editors:

Evangelos Yfipakas, David D. Boehr and Roland Wohlgemuth

Received: 25 October 2021

Accepted: 8 November 2021

Published: 12 November 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The adoption of biocatalysis in solvent-free systems is an alternative to establish a greener esters production. An interesting correlation between the acid:alcohol molar ratio and biocatalyst (immobilized lipase) loading in the optimization of ester syntheses in solvent-free systems had been observed and explored. A simple mathematical tool named Substrate-Enzyme Relation (SER) has been developed, indicating a range of reaction conditions that resulted in high conversions. Here, SER utility has been validated using data from the literature and experimental assays, totaling 39 different examples of solvent-free enzymatic esterifications. We found a good correlation between the SER trends and reaction conditions that promoted high conversions on the syntheses of short, mid, or long-chain esters. Moreover, the predictions obtained with SER are coherent with thermodynamic and kinetics aspects of enzymatic esterification in solvent-free systems. SER is an easy-to-handle tool to predict the reaction behavior, allowing obtaining optimum reaction conditions with a reduced number of experiments, including the adoption of reduced biocatalysts loadings.

Keywords: immobilized lipases; solvent-free reactions; enzymatic esterification; esters

1. Introduction

Solvent-free systems (SFS) are becoming popular for enzymatic esterifications. These systems have many advantages because the reaction media is formed only by the reactants, increasing the volumetric productivity of the process and avoiding complex downstream and hazardous wastes [1–3]. The adoption of solvent-free systems may contribute to achieving the feasibility of biocatalytic ester syntheses on a large scale in both technical and economic aspects, in consonance with the principles of Green Chemistry.

Immobilized lipases have been utilized successfully for esterification reactions in SFS [4–9]. Enzyme immobilization enables enzyme recovery and reuse, associated with the possibility of improving enzyme stability, activity, selectivity, or specificity [10–12]. Moreover, it may enlarge the window of operating conditions (reducing inhibitions or inactivation by chemicals) and be coupled to the purification processes [13–16]. Immobilized lipases are extensively studied for esters syntheses [10,12,17–20], potentially addressing demands in many different sectors such as energy and transport [21–23], food industries [24–26], cosmetics and personal care [19,27], and chemical industries [28–30].

Molar ratio and biocatalyst loading are two of the main parameters studied in solvent-free enzymatic esterifications because this reaction is thermodynamically controlled and, thus, the concentration of the catalyst determines the conversion rate [31–33]. The reaction media and the experimental conditions have major influences on these aspects, and, in

5) Artigo: *Technical-Economic Assessment – The Missing Piece for Increasing the Attractiveness of Applied Biocatalysis in Ester Syntheses?* (Catalysts, 2023, MDPI)



Communication

Technical–Economic Assessment—The Missing Piece for Increasing the Attractiveness of Applied Biocatalysis in Ester Syntheses?

Ronaldo Rodrigues de Sousa ^{1,2}, Rui de Paula Vieira de Castro ², Nadinne Medeiros Assis ^{1,2}, Ayla Sant'Ana da Silva ^{1,2}, Denise Maria Guimarães Freire ², Roberto Fernandez-Lafuente ^{3,4} and Viridiana Santana Ferreira-Leitão ^{1,2,*}

¹ Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology (INT), Ministry of Science Technology and Innovations, Rio de Janeiro 20081-312, Brazil

² Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-909, Brazil

³ Biocatalysis Department, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain

⁴ Center of Excellence in Bionanoscience Research, External Scientific Advisory Academics, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Saudi Arabia

* Correspondence: viridiana.leitao@int.gov.br

Abstract: Although the current literature describes significant advances in biocatalytic ester syntheses, few industrial plants worldwide are currently producing esters using biocatalysts. Green and sustainable esters can be obtained via a biocatalytic route, including some operational advantages over conventional syntheses. An analysis of the literature revealed that most articles neglect or describe the economic issues generically, without quantitative information. Scaling-up studies are also scarce in this field. The main disadvantage of biocatalysis using immobilized lipases—their cost—has not been studied at the same level of depth as other technical aspects. This gap in the literature is less intense in enzymatic biodiesel production studies and, despite the lack of a strict correlation, enzymatic biodiesel commercial plants are relatively more common. Preliminary techno-economic assessments are crucial to identify and circumvent the economic drawbacks of biocatalytic ester syntheses, opening the way to broader application of this technology in a large-scale context.

Keywords: biocatalysis; esters; economic assessment



Citation: de Sousa, R.R.; de Castro, R.d.P.V.; Assis, N.M.; da Silva, A.S.; Freire, D.M.G.; Fernandez-Lafuente, R.; Ferreira-Leitão, V.S. Technical–Economic Assessment—The Missing Piece for Increasing the Attractiveness of Applied Biocatalysis in Ester Syntheses? *Catalysts* **2023**, *13*, 223. <https://doi.org/10.3390/catal13020223>

Academic Editor: Adam Sikora

Received: 3 December 2022

Revised: 10 January 2023

Accepted: 16 January 2023

Published: 18 January 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

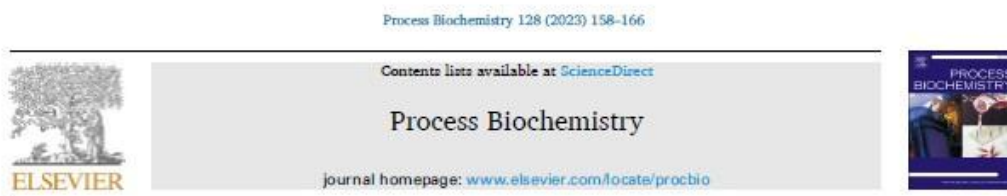
1. Introduction

Esters syntheses are technically feasible using biocatalysts in organic media, including many successful examples in solvent-free systems [1,2]. The advantages of biocatalysis in this field include the reduced severity of the processes and the consequent reduction in occupational risks, the increased purity of the obtained esters, and the reduced complexity of downstream operations [1,3,4], with potential positive impacts on economic, social, and environmental parameters.

Considering esters' importance and market size—estimated to reach USD 3 billion in 2027 [1]—it is notable that few companies are currently producing esters catalyzed by lipases. Ansorge-Schumacher and Thum (2013) [3] and Khan and Rathod (2015) [4] mentioned that companies such as Evonik and Eastman were producing esters by biocatalysis at the time they wrote their papers. Years later, the context remains almost unchanged, although the scientific literature and patents in this field have increased drastically. News about the growing interest of big chemical companies, such as BASF, Dow, Clariant, DuPont, and Solvay, in biotechnologies or enzyme production/applications are frequent. However, it is curious that the higher sustainability and product quality obtained from the biocatalytic production of esters seem not so attractive to the chemical industry context.

The question is always surrounding the high cost of the biocatalysts for ester syntheses—immobilized lipases. However, some industrial biodiesel plants are becoming viable (at

- 6) Artigo: *Butyl Esters Syntheses from Palm Fatty Acid Distillate catalyzed by Immobilized Lipases in Solvent-Free Systems: Optimization using a Simplified Method (SER)* (Process Biochemistry, 2023. Elsevier)



Butyl-esters synthesis from palm fatty acid distillate catalyzed by immobilized lipases in solvent-free system – Optimization using a simplified method (SER)

Ronaldo Rodrigues de Sousa^{a,b}, Carolina da Costa Lázaro^{a,b},
Carinne Borges de Souza Moraes Rego Gomes^a, Ayla Sant'Ana da Silva^{a,b},
Roberto Fernandez-Lafuente^{c,d,*}, Viridiana Santana Ferreira-Leitão^{a,b,*,**}

^a Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology (INT), Ministry of Science, Technology, and Innovation, Rio de Janeiro 20081-312, Brazil

^b Department of Biochemistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro 21941-909, Brazil

^c Biocatalysis Department, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain

^d Center of Excellence in Bioscience Research, External Scientific Advisory Academics, King Abdulaziz University, Jeddah 21589, Saudi Arabia

ARTICLE INFO

Keywords:

Enzymatic esterification
Immobilized lipases
Solvent-free reactions

ABSTRACT

Palm fatty acid distillate (PFAD) is a residual fatty acids rich-stream obtained in the palm oil refining process. Its potential as raw material for butyl esters syntheses using immobilized lipases (Novozym 435® and Lipzyme RM IM®) in solvent-free system have been explored. A simplified tool for optimizing reaction parameters (Substrate-Enzyme Relation, SER) conciliates the masses of reagents and biocatalysts to obtain valuable insights into the shift of chemical equilibrium and the probability of deleterious effects on immobilized lipases. This mathematical relation had been studied when a single acid and alcohol are involved, but here SER is adopted when a mixture of similar chain-length acids is present in the reaction media. Experimental assays have revealed a range of reaction conditions of molar ratio and biocatalyst loadings equivalent to SER = 42 to ~ 12, that achieved maximum conversions higher than 90 % using biocatalysts loading lower than 2.0 % (wt/wt of PFAD mass) and less than 10 % of *n*-butanol stoichiometric excess. Similar SER trends were observed when comparing single reactants conversions results and a mixture of acids (C16–C18) and one alcohol involved, indicating the applicability of SER as optimization tool for enzymatic esterifications using a complex matrix.

1. Introduction

Palm fatty acid distillate (PFAD) is a light brown wax material, generated as a by-product of the palm oil refining in the steps of acidity reduction and deodorization [1–3]. Total PFAD production corresponds to about 4% wt. of the production of palm oil [4,5] and most of this content is directed to animal feed and laundry soap industries. Although the use of palm oil and its derivatives frequently rises concerns about the sustainability of their production processes, it is reasonable to think that this biomass will still remain relevant in the future. Thus, high-added value PFAD applications should be studied aiming for a better destination for this residue [6]. PFAD contains around 90–90 % (%wt/wt) of

free fatty acids, mainly palmitic and oleic acids. Other components are found in smaller amounts as tri-, di- and mono glycerides, and unsaponifiable components like vitamin E, sterols, squalene, and volatile components [1,2,4,7].

High-yield enzymatic syntheses using PFAD as raw material were described by some authors, including synthesis of biodiesel and bio-lubricants [4,8–11], sugar fatty acid esters and surfactants [8,12–16] and wax esters [2] even in solvent-free systems. Solvent-free condition is desirable in terms of costs, the complexity of the process, and environmental impacts [16–19]. One important peculiarity of this kind of system is the continuous change of the physicochemical properties of the system, starting just with the substrates and ending with the product

* Corresponding author at: Biocatalysis Department, ICP-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain.

** Corresponding author at: Biocatalysis Laboratory, National Institute of Technology (INT), Ministry of Science, Technology, and Innovation, Rio de Janeiro 20081-312, Brazil.

E-mail addresses: ronaldo.rodrigues@int.gov.br (R.R. Sousa), carolina.costa@int.gov.br (C.C. Lázaro), gomes.carinne@gmail.com (C.B.S.M.R. Gomes), ayla.santana@int.gov.br (A.S. Silva), rlf@icp.csic.es (R. Fernandez-Lafuente), viridiana.leitao@int.gov.br (V.S. Ferreira-Leitão).

<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2023.02.030>

Received 4 November 2022; Received in revised form 31 January 2023; Accepted 27 February 2023

Available online 28 February 2023

1359-5113/© 2023 Elsevier Ltd. All rights reserved.

- 7) Capítulo de livro: *Opportunities and Challenges for the Production of Chemicals: Materials and Processes for Biorefineries* (In: *Biotechnology of Microbial Enzymes*, 2023, Elsevier).

Chapter 21

Opportunities and challenges for the production of fuels and chemicals: materials and processes for biorefineries

Carolina Reis Guimarães¹, Ayla Sant'Ana da Silva^{1,2}, Daniel Oluwagbotemi Fasheun^{1,2}, Denise M.G. Freire², Elba P.S. Bon², Erika Cristina G. Aguiéiras^{2,3}, Jaqueline Greco Duarte^{2,4}, Marcella Fernandes de Souza⁵, Mariana de Oliveira Faber^{1,2}, Marina Cristina Tomasini^{1,2}, Roberta Pereira Espinheira^{1,2}, Ronaldo Rodrigues de Sousa^{1,2}, Ricardo Sposina Sobral Teixeira² and Viridiana S. Ferreira-Leitão^{1,2}

¹National Institute of Technology, Ministry of Science, Technology and Innovation, Avenida Venezuela, Rio de Janeiro, Brazil, ²Federal University of Rio de Janeiro, Department of Biochemistry, Rio de Janeiro, Brazil, ³Federal University of Rio de Janeiro, Campus UFRJ - Duque de Caxias Prof. Geraldo Cidade, Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴SENAI Innovation Institute for Biosynthetics and Fibers, SENAI CETIQT, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Ghent University, Faculty of Bioscience Engineering, Gent, Belgium

21.1 Introduction

Global primary energy consumption that increases yearly has been predominantly sourced from fossil fuels. According to the [Statistical Review of World Energy \(2021\)](#), 84% of total consumed energy in 2019 was of fossil origin. Consequently, so far continuous use of fossil resources and carbon dioxide emissions keep building up in the atmosphere, increasing global climate changes. The severity of this scenario has been pushing nations to seek solutions through environmental treaties. One of them is the Paris Agreement, a treaty signed by the United Nations in 2015 aiming to reduce greenhouse gas (GHG) emissions and, by extension, control the increase in global temperature from 2020 onward ([Christensen and Olhoff, 2019](#); [Höhne et al., 2019](#)). However, to achieve this goal, it is necessary to change the energy source from fossil to renewables, whereby fuels and chemicals would be produced from renewable materials. This approach has been considered a

8) Artigo; *Immobilized Lipases in the Synthesis of Short-Chain Esters: An Overview of Constraints and Perspectives* (Catalysts, 2025, MDPI)



catalysts



Review

Immobilized Lipases in the Synthesis of Short-Chain Esters: An Overview of Constraints and Perspectives

Ronaldo Rodrigues de Sousa ^{1,2}, Michelle M. dos Santos ^{1,2}, Matheus W. R. Medeiros ¹, Evelin A. Manoel ³, Ángel Berenguer-Murcia ⁴, Denise Maria Guimarães Freire ², Roberto Fernandez-Lafuente ^{5,*} and Viridiana Santana Ferreira-Leitão ^{1,2,*}

¹ Laboratório de Biocatálise, Bioprocessos e Bioprodutos (LABIC) Instituto Nacional de Tecnologia (INT/MCTI), Rio de Janeiro 200081312, RJ, Brazil; ronaldo.rodrigues@int.gov.br (R.R.d.S.); michelle.marques@int.gov.br (M.M.d.S.); matheus.medeiros@int.gov.br (M.W.R.M.)

² Programa de Pós-Graduação em Bioquímica/Instituto de Química (PPG-Bq/IQ), Universidade Federal do Rio de Janeiro—UFRJ, Avenida Athos da Silveira Ramos, 149, Rio de Janeiro 21941-909, RJ, Brazil; denise.freire@iq.ufrj.br

³ Departamento de Biotecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal do Rio de Janeiro—UFRJ, Avenida Carlos Chagas Filho, 373, Bloco K, Rio de Janeiro 21941-972, RJ, Brazil; eamanoel@pharma.ufrj.br

⁴ Departamento de Química Inorgánica e Instituto Universitario de Materiales, Universidad de Alicante, 03690 Alicante, Spain; a.berenguer@ua.es

⁵ Departamento de Biocatálisis, ICI3-CSIC, Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain

* Correspondence: rrl@icp.csic.es (R.F.-L.); viridiana.leitao@int.gov.br (V.S.F.-L.)

Abstract Biocatalysis—specifically the use of immobilized lipases—has been proposed as a greener alternative for ester production. Several critical challenges, such as the high cost of biocatalysts, are delaying the industrial implementation of biocatalysis. Moreover, for short-chain ester synthesis, the strong inhibition/inactivation potential of short-chain acids and alcohols on lipases leads to long reaction cycles and/or the need to use organic solvents to overcome the limitations of solvent-free systems and, consequently, the decrease in product concentrations. This review presents an overview of the scientific developments in enzymatic short-chain ester synthesis, compiling the constraints on their syntheses from a process perspective, including insights about key performance indicators (KPI) and economic parameters.

Keywords: esters; biocatalysis; lipases; immobilized enzymes; short-chain esters



Academic Editor: Evangelos Topakas

Received: 11 March 2025

Revised: 7 April 2025

Accepted: 9 April 2025

Published: 11 April 2025

Citation: Sousa, R.R.d.; dos Santos, M.M.; Medeiros, M.W.R.; Manoel, E.A.; Berenguer-Murcia, A.; Freire, D.M.G.; Fernandez-Lafuente, R.; Ferreira-Leitão, V.S. Immobilized Lipases in the Synthesis of Short-Chain Esters: An Overview of Constraints and Perspectives. *Catalysts* **2025**, *15*, 375. <https://doi.org/10.3390/catal15040375>

Copyright: © 2025 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Ester synthesis has been intensively explored in the scientific literature throughout the past decades [1–6]. Biocatalytic routes have gained great relevance in this field due to their environmental benefits toward greener and sustainable processes in chemical industries [7–11]. The adoption of biocatalysis in ester syntheses using lipases (E.C. 3.1.1.3) in immobilized form is challenging considering the high costs involved in the process and other technical drawbacks related to their catalytic activity and/or operational stability [5,8,12]. These drawbacks are more significant when considering the synthesis of short-chain esters, due to the acidity induced by short-chain acids, their relative hydrophilic characteristics, and the enzyme inactivation potential of short-chain alcohols [13–18]. Short-chain esters, whose chain length range comprises molecules containing 2 to 10 total carbons, are well known for their high volatility and flavor/fragrance properties. These compounds are derived from short-chain carboxylic acids and alcohols usually found in the metabolism