

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

WAGNER CARLOS DE ALCANTARA CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO ENZIMÁTICO PARA A PRODUÇÃO
DE BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA REFINADO E DE
FRITURA**

Alfenas/MG

2021

WAGNER CARLOS DE ALCANTARA CARVALHO

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO ENZIMÁTICO PARA A PRODUÇÃO DE
BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA REFINADO E DE FRITURA

Dissertação de Mestrado apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Bioprocessos

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Coorientadora: Prof. Dra. Daniela Battaglia Hirata

Alfenas – MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Carvalho, Wagner Carlos de Alcantara.

C331d Desenvolvimento de um processo enzimático para a produção
de biolubrificantes a partir de óleo de soja refinado e de fritura. / Wagner
Carlos de Alcantara Carvalho -- Alfenas/MG, 2021.

92f. il. --

Orientador: Adriano Aguiar Mendes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de
Alfenas, 2021.

Bibliografia.

1. Óleo de Soja – análise. 2. Lubrificantes. 3. Imobilização. 4. Enzimas
- biossíntese. I. Mendes, Adriano Aguiar. II. Título.

CDD-660.6

WAGNER CARLOS DE ALCANTARA CARVALHO

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO ENZIMÁTICO PARA A PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE ÓLEO DE SOJA REFINADO E DE FRITURA

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Linha de Pesquisa: Biomoléculas

Aprovado em: 28 de maio de 2021

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Cleide Mara Faria Soares
Instituição: Universidade Tiradentes

Prof. Dr. Ernandes Benedito Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Aguiar Mendes, Presidente**, em 28/05/2021, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ernandes Benedito Pereira, Professor do Magistério Superior**, em 28/05/2021, às 16:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cleide Mara Faria Soares, Usuário Externo**, em 28/05/2021, às 16:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



[A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0521605** e o código CRC **A04D3399**.

Dedico esta tese primeiramente à Deus, e em especial aos meus pais pelo apoio incondicional mesmo longe, aos meus amigos da minha cidade e aos que eu consegui no meio da jornada profissional pelo suporte emocional e afetivo no decorrer dos anos de vivência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar comigo em todos os momentos e principalmente quando ninguém mais podia estar, e por me guiar pelos melhores caminhos sempre me tornando uma pessoa melhor.

Um agradecimento incondicional para os meus pais José Carlos e Dagmar e meu irmão Glaubert por todo apoio e por moldar meu caráter desde pequeno, por todo sacrifício de estar longe, por todas as orações, por segurarem na minha mão toda vez que pensei em fraquejar ou desanimar, acima de tudo, todo o amor e carinho que sempre fizeram muita diferença nessa caminhada.

Aos meus amigos de infância que estão comigo em todas as fases da minha vida me apoiando, puxando a orelha e me incentivando em todas as minhas escolhas, além de todas as resenhas e comemorações que tornaram minha vida profissional muito mais leve.

Para aqueles irmãos que construí em alfenas e todo tipo de laço afetivo que fez total diferença na caminhada, encontrei diversas pessoas que sempre levarei comigo, todos foram muito importantes para a pessoa que me tornei no fim desta etapa.

O meu muito obrigado a todos os meus colegas de trabalho que sempre estiveram comigo nos piores momentos e nos momentos de descontração, Rafaela Gama, Nicole Okura, Wilian de Souza foram fundamentais para essa fase ser mais leve e divertida com todas as fofocas, brincadeira e reclamações. Ao técnico Gustavo que sempre esteve disposto a toda ajuda, aos terceirizados que sempre me trataram com muita educação e fizeram parte sempre auxiliando para que o laboratório estivesse nas melhores condições para o meu trabalho. Ao núcleo do Bioprocessos, em geral, por me acolherem nesses 2 anos de pesquisa e todos os professores que fizeram muita diferença no meu crescimento, agregando muito conhecimento.

Não poderia deixar de lado meus espelhos profissionais nessa jornada, Adriano Aguiar Mendes e Daniela Battaglia Hirata, pessoas que são integras e que me mostraram como é amar o que se chama de trabalho, palavras não descreveriam a imensa gratidão que tenho por poder trabalhar com especialistas na área da pesquisa e os ter como meus orientadores, sempre me colocando pra cima independente da situação. De ter a possibilidade de ser considerado não aluno, como fui dos dois no período da graduação, mas de me sentir um colega de trabalho, que foi a primeira coisa que reparei de diferente da graduação pra pós, e hoje no final dessa jornada eu

consigo falar que minha maior alegria foi ter sido respeitado e tratado como um igual por pessoas que são maravilhosas como pessoas, sem contar a excelência que fazem no seu trabalho, um obrigado do fundo do meu coração.

Um agradecimento especial pela força que adquiri nessa etapa da minha vida, todas as dificuldades que encontrei e pude superar independente de qual tenha sido, obtendo uma evolução pessoal e profissional gigantesca e muito visível, apenas agradecer por tudo que construí em meados dos meus 24 anos de idade, totalmente realizado e feliz com o que foi proposto e foi realizado por mim nesse momento mundial, foi muita trabalho realizado, muitas frustrações e muitas alegrias, momentos que ficarão marcados pelo resto de minha vida independente de qual seja o meu caminho futuro. O meu muito obrigado a todos que fizeram parte disso comigo. Ninguém chega a nenhum lugar sozinho e eu tive as melhores pessoas possíveis pra realizar essa conquista.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, e concessão da bolsa que possibilitou a realização desse projeto. Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo 404929/2016–8) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-02196-15) pelo suporte financeiro.

“TODOS QUE PASSAM POR NÓS NUNCA FICAM SÓ, SEMPRE DEIXAM UM POUCO DE SI, E SEMPRE LEVAM UM POUCO DE NÓS”

RESUMO

Neste estudo, triésteres de trimetilolpropano – TMPTEs (biolubrificantes) foram produzidos por hidroesterificação enzimática dos óleos de soja refinado (OSR) e de fritura (OF). Na primeira etapa, a hidrólise enzimática foi realizada catalisada por extrato bruto em de lipase de *Candida rugosa* (LCR) na produção de ácidos graxos livre (AGL) em um sistema de emulsificantes. A hidrólise completa dos óleos foi obtida após 3 h de reação a 40°C, usando 3,2 g/L de LCR na forma em pó, agitação mecânica de 1500 rpm e razão mássica óleo/água de 40% e 50% para OF e OSR, respectivamente. Em seguida, LCR e as lipases de *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase® 100L e Eversa® Transform 2.0) e *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) foram imobilizadas via ativação interfacial em partículas esféricas de poliestireno-divinilbenzeno (PSDVB). O procedimento de imobilização foi realizado pela mistura de extratos brutos de lipases com tampão acetato de sódio (5 mM) em pH 5,0 por 18 h de contato sob agitação mecânica (200 rpm) empregando um carregamento fixo de carga de proteína de 40 mg/g de suporte. Os diferentes biocatalisadores preparados obtiveram um alto rendimento de imobilização (acima de 85%). Em seguida, os extratos brutos de lipases (forma livre) e os biocatalisadores imobilizados preparados foram empregados na produção de TMPTEs via esterificação enzimática dos AGL produzidos na etapa de hidrólise com trimetilolpropano (TMP) em sistemas isentos de solventes orgânicos. De acordo com os resultados obtidos, a maior atividade catalítica na hidrólise da emulsão do azeite de oliva em pH 8,0 e 37°C foi observada para o biocatalisador heterogêneo preparado pela imobilização de Lipolase® 100L (255,9 ± 3,9 U/g). Entretanto, Eversa® Transform 2.0 imobilizada em PSDVB foi o biocatalisador mais ativo na produção de TMPTEs e a máxima conversão de OH de ≈97% usando ambas as fontes de AGL foi alcançada após 4 h de reação conduzida em reatores abertos para a eliminação de moléculas de água formada durante a reação a 55°C, razão molar TMP:AGL de 1:3,25 (0,77 g TMP – 5,74 mmol; 5,23 g AGL – 18,77 mmol), agitação mecânica de 240 rpm e 15% da massa de biocatalisador por massa de materiais de partida. Nestas mesmas condições, a conversão de OH de ~25% após 5 h de reação foi obtida usando Novozym® 435, um biocatalisador heterogêneo comercial amplamente usado em reações de biotransformação. Eversa® Transform 2.0 imobilizada em PSDVB reteve acima de 90% de sua atividade original após 13 bateladas consecutivas de reação de 4 h cada, usando AGL de OSR e OF como materiais de partida. Os TMPTEs produzidos apresentaram boas propriedades

em baixas temperaturas (pontos de fluidez entre -11 e -9 °C). Esses ésteres também exibiram valores de viscosidade cinemática semelhantes a 40°C – $36,6$ mm^2/s para TMPTEs de OSR e $34,4$ mm^2/s para TMPTEs de OF. Estes resultados mostram que Eversa[®] Transform 2.0 imobilizada via ativação interfacial em partículas de PSDVB pode ser uma opção interessante como biocatalisador heterogêneo para catalisar a produção de ésteres com propriedades lubrificantes em processos industriais devido à sua alta atividade catalítica e estabilidade após sucessivas bateladas de reação.

Palavra chave: Biolubrificantes, Óleos de soja, Lipases, Imobilização, Ativação interfacial, Eversa[®] Transform 2.0, propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

In this study, trimethylolpropane triesters – TMPTEs (biolubricants) have been produced by a two-step enzymatic hydroesterification process using refined soybean (RSO) or used soybean cooking (USCO) oils as starting materials. In the first step, enzymatic hydrolysis was performed catalyzed by a crude free lipase extract from *Candida rugosa* (CRL) to produce free fatty acids (FFAs) in an emulsifier-free system. Complete hydrolysis of the oils were achieved after 3 h of reaction at 40 °C, using 3.2 g/L of CRL, mechanical agitation using an overhead motor stirrer at 1500 rpm and oil/water mass ratio of 40% and 50% for USCO and RSO, respectively. After, CRL, and the lipases from *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase[®] 100L and Eversa[®] Transform 2.0) and *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) were immobilized via interfacial activation on polystyrene-divinylbenzene (PSty-DVB) beads. The immobilization procedure has been performed by mixing crude lipase extracts with 5 mM buffer sodium acetate at pH 5.0 for 18 h of contact under mechanical stirring (200 rpm) using a fixed protein loading of 40 mg/g of support. High enzyme loaded biocatalysts (immobilization yield above 85%) were obtained for all lipase preparations. Then, free lipases (liquid or powder forms) or immobilized biocatalysts were used to produce TMPTEs via enzymatic esterification of the produced FFAs with trimethylolpropane (TMP) in solvent-free systems. According to results, the highest activity in olive oil emulsion hydrolysis at pH 8.0 and 37 °C was observed when using Lipolase[®] 100L (255.9 ± 3.9 U/g). On the other hand, immobilized Eversa[®] Transform 2.0 was the most active biocatalyst in TMPTEs production and maximum OH conversion of ≈97% using both FFA sources was achieved after 4 h of reaction conducted in open reactors in order to eliminate the formed water during the reaction at 55 °C, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25 (0.77 g TMP – 5.74 mmol; 5.23 g FFA – 18.77 mmol), mechanical stirring rate of 240 rpm, and 15% of mass of biocatalyst per mass of starting materials. Under similar conditions, OH conversion of ~25% after 5 h of reaction was obtained using Novozym[®] 435, a commercial immobilized lipase widely used in biotransformation reactions. Immobilized Eversa[®] Transform 2.0 retained above 90% of its original activity after 13 consecutive reaction batches of 4 h each using both FFA from RSO and USCO as starting materials. The produced TMPTEs presented good cold temperature properties (pour point values between –11 and –9 °C). These esters also exhibited similar kinematic viscosity values at 40 °C – 36.6 mm²/s for TMPTEs from RSO and 34.4 mm²/s for TMPTEs from USCO. These results

show that Eversa[®] Transform 2.0 immobilized via interfacial activation on PSty-DVB particles can also be an interesting option as heterogeneous biocatalyst to catalyze the production of synthetic esters with lubricant properties in industrial processes due to its high catalytic activity and reusability.

Keywords: Biolubricants, Soybean-based oils, Lipases, Immobilization, Interfacial activation, Eversa[®] Transform 2.0, Physicochemical properties.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Lipase imobilizada via ativação superficial em superfície hidrofóbica.....	21
Figura 2 - Imobilização via ativação interfacial em suporte hidrofóbico.....	23
Figura 3 - Possíveis mecanismo de imobilização de lipases em diferentes suportes..	30
Figura 4 - Esquema representativo da produção de biolubrificante (ésteres de TMP) por sequencial hidrólise do óleo de soja e esterificação.....	35

CAPÍTULO 1

Figure 1 - Representative scheme of TMPTEs production via enzymatic hydroesterifications of refined and used soybean cooking oils.....	49
Figure 2 - Effect of lipase source (crude extracts or immobilized on PSty-DVB) on the TMPTEs production. Esterification reactions at 55 °C by 24 h using TMP:FFA molar ratio of 1:3, 240 rpm, and protein concentration of 2.5 mg/g of reaction mixture.....	63
Figure 3 - Effect of TMP:FFA molar ratio on TMPTEs production catalyzed by Eversa® Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB at a proportion of 10% m/m (3.36 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture). The reactions were conducted in closed glass reactors at 55 °C, 240 rpm and 24 h.....	64
Figure 4 - Effect of immobilized Eversa® Transform 2.0 concentration on TMPTEs production. Esterification reactions conducted in closed glass reactors by 24 h at 55 °C, 240 rpm and TMP:FFA molar ratio of 1:3.25.....	66
Figure 5 - Effect of water removal strategies on TMPTEs production. Esterification reactions were performed at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, 15% m/m of immobilized Eversa® Transform 2.0 on PSty-DVB, 24h of reaction using closed or open glass reactors in the absence or presence of molecular sieves (MS) at a fixed concentration of 5% m/m of reaction mixture.....	67
Figure 6 - TMPTEs production catalyzed by Eversa® Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB and Novozym® 435 using FFA from RSO (open symbols) and USCO (closed symbols). The reactions were performed at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, 15% m/m of biocatalyst per gram of reaction mixture in open glass reactors in the absence of molecular sieves.....	69
Figure 7 - ¹ H NMR spectra of TMPTEs produced from RSO (A) and USCO (B).....	70

Figure 8 - Biocatalyst operational stability tests for TMPTEs production using FFA from RSO (white bars) and USCO (gray bars) catalyzed by Eversa® Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB. The reactions were performed in open glass reactors in the absence of molecular sieves at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, and 15% m/m of biocatalyst per gram of reaction mixture.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Metodologias de imobilização e suas diversas aplicações.....	25
Tabela 2 - Lipases imobilizadas para a produção de biolubrificantes.....	32

CAPÍTULO 1

Table 1 - Technical informations and properties of the crude lipase preparations used in this study.....	52
Table 2 - Properties of the biocatalysts prepared via interfacial activation of lipases on PSty-DVB beads.....	61
Table 3 - Physicochemical properties of TMPTEs and comparison with commercial and produced TMPTEs in previous reports.....	72
Table 4 - Literature survey for enzymatic production TMP esters.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS

LTL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
LPF	Lipase de <i>Pseudomonas fluorescens</i>
PI	Proteína Imobilizada
AH	Atividade Hidrolítica
AE	Atividade específica
AGL	Ácidos graxos livre
TMP	Trimetilolpropano
PSDVB	Poli(estireno-divinilbenzeno)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO	20
2.1	Enzimas.....	20
2.2	Lipases	20
2.3	Imobilização de lipases	22
2.4	Suportes para a imobilização de lipases	28
2.5	Imobilização de lipases via ativação interfacial em suportes hidrofóbicos	29
2.6	Aplicação de lipases imobilizadas em síntese de ésteres	31
2.7	Matéria prima	33
3	ARTIGO 1: ECO-FRIENDLY PRODUCTION OF TRIMETHYLOLPROPANE TRIESTERS FROM REFINED AND USED SOYBEAN COOKING OILS USING AN IMMOBILIZED LOW-COST LIPASE (EVERSA TRANSFORM 2.0 AS HETEROGENEOUS BIOCATALYST	44
4	CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO	92
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	93
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Lubrificantes são compostos orgânicos capazes de reduzir o atrito entre duas superfícies móveis, além de diminuir o aquecimento e o desgaste das peças mecânicas pela formação de uma película de proteção (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017; HO; MCAULEY; PEPPLEY, 2019). Os lubrificantes à base de petróleo se estabeleceram como lubrificantes universais para a maioria das aplicações industriais, comerciais e pessoais. O mercado global de lubrificantes em 2018 foi de US\$ 128,51 bilhões. A projeção de crescimento mundial para 2022 é de 43,87 milhões de toneladas a uma taxa de crescimento anual de 2,4% (GRAND VIEW RESEARCH INC., 2020). Cerca de 55% destes lubrificantes são descartados inadequadamente ao meio ambiente e cerca de 95% são de origem fóssil e altamente prejudiciais aos ecossistemas devido à sua alta toxicidade e baixa biodegradabilidade (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017).

Nos últimos anos, a crescente consciência ambiental torna-se a principal força motriz para o desenvolvimento de novas tecnologias de forma que os lubrificantes sintéticos biodegradáveis (biolubrificantes) constituem uma área extensivamente explorada no âmbito da Química Verde (ZAINAL *et al.* 2018). O termo "biolubrificante" é atribuído aos lubrificantes obtidos de matérias-primas renováveis como triacilgliceróis – óleos vegetais, gorduras animais, óleos residuais e óleos microbianos (SABOYA *et al.*, 2016; SABOYA *et al.*, 2017; BAHADI *et al.*, 2019; CAVALCANTI *et al.*, 2018; CERÓN *et al.*, 2018; ZAINAL *et al.*, 2018; OH *et al.*, 2013; ANGULO *et al.*, 2020 ; FERNANDES *et al.*, 2020). Os triacilgliceróis possuem algumas vantagens para serem aplicados na produção de biolubrificantes tais como elevado índice de viscosidade, alto ponto de fulgor, baixa volatilidade e boa adesão às superfícies metálicas (ZAINAL *et al.*, 2018; HO; MCAULEY; PEPPLEY, 2019). Além disso, os biolubrificantes apresentam propriedades físico-químicas similares ou melhores que os lubrificantes convencionais oriundos de fontes fósseis (ZAINAL *et al.* 2018).

Estes compostos podem ser produzidos por diferentes rotas tais como esterificação, transesterificação, hidroesterificação e epoxidação empregando catalisadores químicos clássicos e enzimas (lipases). Porém, diversas limitações como requerimento de altas temperaturas (120 – 180°C), longos tempos de reação e geração de resíduos químicos nos processos de separação e purificação são reportadas para a rota química empregando catalisadores homogêneos como ácidos inorgânicos (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, ácido *p*-toluenossulfônico, etc.) e bases (NaOH e

KOH) e heterogêneos como resinas catiônicas, óxidos e bases (OH *et al.*, 2013; IVANTAN *et al.*, 2017; SABOYA *et al.*, 2016; SABOYA *et al.*, 2017; BAHADI *et al.*, 2019; ANGULO *et al.*, 2020). Com o propósito de solucionar esses problemas, a aplicação de lipases é uma alternativa promissora para a produção destes ésteres devido à demanda crescente por produtos ambientalmente sustentáveis (BASSI *et al.*, 2016; CAVALCANTI *et al.*, 2018; ÂNGULO *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2020).

Lipases (triacilglicerol éster acilhidrolases – EC 3.1.1.3) são enzimas que catalisam a hidrólise de triacilgliceróis (óleos e gorduras) em meios aquosos. Em meios não-aquosos, estas enzimas catalisam a síntese de ésteres industriais, como biolubrificantes, por reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (KAPOOR; GUPTA, 2012; ADLERCREUTZ, 2013; BASSO e SERBAN, 2019). A produção enzimática de biolubrificantes tem sido preferencialmente realizada empregando lipases imobilizadas para aumentar sua atividade catalítica, estabilização térmica e mecânica, facilitar a sua reutilização em bateladas sucessivas de reação e aumentar a flexibilidade de configurações de reatores em modo contínuo como reator de leito fixo, leito fluidizado, reator contínuo agitado mecanicamente, etc (BASSI *et al.*, 2016; CAVALCANTI *et al.*, 2018; CERÓN *et al.*, 2018; ANGULO *et al.*, 2020; FERNANDES *et al.*, 2020).

Estas enzimas tem sido imobilizadas por diferentes protocolos tais como: (i) adsorção física por meio de interações hidrofóbicas, (ii) adsorção em suportes aniônicos e/ou catiônicos, (iii) aprisionamento em suportes inertes, (iv) ligação covalente em suportes previamente ativados e (v) reticulação – enzimas agregadas (CLEAs – *Crosslinked Enzyme Aggregates*) (ADLERCREUTZ, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2019). Entretanto, as reações conduzidas em meios não aquosos, dentre elas a produção de biolubrificantes por esterificação e/ou transesterificação, não são requeridas fortes interações entre a enzima e o suporte porque lipases são insolúveis nestes meios (SECUNDO *et al.*, 2008; MENDES *et al.*, 2012). Consequentemente, a adsorção física em suportes hidrofóbicos é o método mais empregado na imobilização de lipases porque em alguns casos melhora sensivelmente a sua estabilização e atividade catalítica em meios não-aquosos e permite regenerar o suporte após a inativação de lipases por dessorção empregando agentes químicos como tensoativos (RODRIGUES *et al.*, 2019). Diferentes lipases possuem uma cadeia polipeptídica (denominada tampa ou aba) que cobre seus sítios ativos, bloqueando assim a acessibilidade de seus substratos (gotículas de óleo) – “conformação fechada”. Na

presença de uma interface hidrofóbica, como suportes hidrofóbicos ou gotículas de óleos, a tampa é deslocada e uma bolsa hidrofóbica ao redor da região de seus sítios ativos é exposta ao meio (conformação aberta) – mecanismo de ativação interfacial. A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos tem sido tipicamente realizada em baixa força iônica para mudar o equilíbrio conformação fechada/aberta para a conformação aberta e reduzir possível agregação de lipases na conformação aberta (formação de dímeros de lipases em conformação aberta) (MANOEL *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019).

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi a produção enzimática de biolubrificantes por esterificação de ácidos graxos livres provenientes do óleo de soja (refinado e de fritura) com TMP, um dos polióis mais empregados na síntese de biolubrificantes (ZAINAL *et al.*, 2018; HO; MCAULEY; PEPPLEY, 2019), em meio isento de solventes. A relevância de empregar óleo de soja como matéria-prima oleaginosa se deve à sua fácil disponibilidade em nosso país. Na safra 2019/2020, a produção mundial foi de 337,3 milhões de toneladas de grãos e a produção brasileira foi de 124,85 milhões de toneladas, sendo o maior produtor mundial desta oleaginosa (EMBRAPA SOJA, 2020). Além da grande disponibilidade dessa oleaginosa em nosso território nacional, o óleo de soja é frequentemente encontrado como resíduo em aterros e rios de industriais alimentícias, o óleo de cozinha residual ou óleo de fritura (AGUIEIRAS *et al.*, 2020). Este resíduo tem um grande potencial para gerar resultados promissores para a produção de ésteres com características lubrificantes, já que a possível substituição do óleo comestível pelo óleo residual pode proporcionar valores equivalentes de taxa de conversão na esterificação, sendo mais vantajoso pelo simples fato do aproveitamento de um resíduo, o que foi algo bem relevante a se levar em consideração na escolha dessa oleaginosa para o possível reaproveitamento do óleo de fritura (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Neste estudo, 4 diferentes preparações comerciais de lipases como LTL (Lipolase® 100 L e Eversa® Transform 2.0), LCR, e LPF nas formas livre (biocatalisadores homogêneos) e imobilizadas em PSDVB (biocatalisadores heterogêneos) foram empregadas com o intuito de selecionar o mais ativo em reação de esterificação. É importante ressaltar que a aplicação dos biocatalisadores preparados neste estudo ainda não é reportada pela literatura especializada.

Um dos principais requisitos para a seleção de suportes para a imobilização de enzimas industriais é a sua elevada área superficial e tamanho de poros (BASSI *et al.*,

2016; ALVES *et al.*, 2017). Neste contexto, materiais porosos são amplamente empregados para esta finalidade com o intuito de obter biocatalisadores com alta carga enzimática e, conseqüentemente, atividade catalítica (BASSI *et al.*, 2016). Neste estudo, partículas de PSDVB foram empregadas na imobilização das diferentes preparações comerciais de lipases selecionadas para a produção de biolubrificante porque este suporte tem uma massa específica de $1,01 \text{ g/cm}^3$, diâmetro de partícula de 250–850 μm , área de superfície específica de $\approx 500 \text{ m}^2/\text{g}$ e tamanho médio de poro de 260 Å (Diaion® HP-20 – informações técnicas da Supelco). Estes poros podem ser suficientemente grandes para acomodar elevada concentração de moléculas de lipases nas superfícies interna e externa do suporte.

O objetivo geral do projeto se deu pela síntese de éster com propriedades biolubrificantes por uma rota mais ecológica a partir de óleo de soja refinado e residual com biocatalisador heterogêneo, foi alcançado mediante à execução dos seguintes objetivos específicos:

- a) preparação e caracterização das propriedades dos biocatalisadores heterogêneos preparados em reações de hidrólise e esterificação;
- b) seleção do biocatalisador (homogêneo ou heterogêneo) mais ativo na produção de ésteres;
- c) avaliação do efeito de fatores (razão molar TMP:AGL, concentração de biocatalisador e estratégia de remoção de água) na produção do éster;
- d) testes de reuso após bateladas sucessivas de reação com óleo refinado e residual;
- e) purificação e caracterização das estruturas químicas por ressonância magnética nuclear (RMN) e propriedades físico-químicas como viscosidade e ponto de fluidez;
- f) comparação das propriedades físico-químicas do produto sintetizado com ésteres de TMP publicados e disponíveis comercialmente.

A dissertação do mestrado está dividida em dois capítulos, além desta introdução.

O capítulo 1 contempla um artigo intitulado “Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa® Transform 2.0) as heterogeneous biocatalyst” submetido no periódico indexado FUEL. Esse artigo aborda a síntese de um éster com característica biolubrificante com uma rota mais ecológica.

2 REVISÃO

2.1 Enzimas

Enzimas são biocatalisadores de natureza proteica que tem por finalidade acelerar reações químicas. Tem a função de levar a reação para o seu equilíbrio de uma forma acelerada, provocando uma mudança favorável na energia do sistema. O uso de enzimas em biocatálise é bem consolidado com relação ao estabelecimento de processos mais sustentáveis com finalidade biotecnológica (GIRELLI; ASTOLFI; SCUTO, 2020; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2019). A alta seletividade e especificidade enzimática é resultado da estruturação quaternária de cada enzima, proporcionando uma gama de aplicações em diversos setores. O aumento populacional e a busca por processos mais ecológicos impulsionaram a produção de uma grande demanda por produtos e compostos que consigam suprir todos os ramos da indústria, sendo assim, um aprimoramento e aperfeiçoamento de técnicas é necessário. O mercado das enzimas não ficou para trás e teve um grande desenvolvimento decorrente desses avanços. (STAVROVA; EHLEBRACHT; FETCHENHAUER, 2016; CASTILLA *et al.*, 2018; SUN *et al.*, 2018).

O grande avanço da utilização de enzimas recorre das novas metodologias que vem sendo desenvolvidas tanto para a descoberta quanto para a modificação dessas biomoléculas. O desenvolvimento do setor enzimático no ano de 2017 foi avaliado em aproximadamente 7 milhões de dólares e há uma previsão que em 2024 ele alcance 11 milhões, se mantida uma taxa de crescimento de 5,7% entre 2018-2024. (Allied Market Research, 2018)

As enzimas podem ser obtidas de várias fontes; animal, vegetal ou microbiana. Esta última possibilita a obtenção de um maior número de enzimas devido à grande variedade de microrganismo existentes e ainda permite a utilização das novas tecnologias de modificações genética (BORNSCHEUER *et al.*, 2019; FREY; HAYASHI; BULLER, 2019). A ampla gama de variedades enzimáticas proporciona uma extensa lista de aplicações em diversas áreas da indústria, que são beneficiadas pela utilização de enzimas, sejam elas da forma livre ou imobilizada, tais como: a indústria de alimentos (ZHANG; HE; SIMPSON, 2018), farmacêutica (NAGHDI *et al.*, 2018), cosmética (KHAN; RATHOD, 2015), têxtil (MADHU; CHAKRABORTY, 2017), biolubrificantes (CAVALCANTI *et al.*, 2018), entre outras.

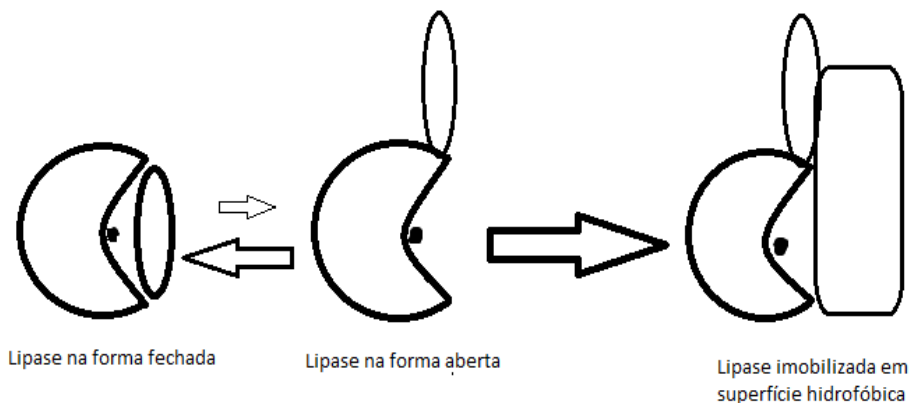
2.2 Lipases

As lipases (éster triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) desempenham uma pluralidade de funções em diversos setores industriais pela sua ampla especificidade por substratos, disponibilidade comercial e sua capacidade de atuar em concentrações de substrato bem elevadas, tanto em ambientes aquosos (natural dessa classe de enzimas), quanto em solventes orgânicos (RODRIGUES *et al.*, 2019; SEDDIGI *et al.*, 2017).

A atividade *in vivo* das lipases é a hidrólise de triacilgliceróis (ZECHNER *et al.*, 2012), e elas podem ser usadas *in vitro* para catalisar reações como esterificação (AGUIEIRAS *et al.*, 2019; BARSÉ *et al.*, 2019; CRUZ *et al.*, 2018), transesterificação (LÖFGREN *et al.*, 2019; BAUWELINCK *et al.*, 2018), interesterificação (ou acidólise) (ABED *et al.*, 2018; CHOJNACKA; GŁADKOWSKI, 2018).

A atratividade das lipases é grande pela sua especificidade região e enantioseletiva, que é causada pelo seu modo de ação específico, a ativação interfacial, que reconhece superfícies hidrofóbicas no meio, o que promove uma interação e conseqüentemente uma super ativação, representado na figura 1 (CAO; MATSUDA, 2016).

Figura 1 - Lipase imobilizada via ativação interfacial em superfície hidrofóbica.



Fonte: do autor

A grande versatilidade dessas enzimas é considerada uma característica promíscua, termo que melhor a descreve, diferenciando das demais classes pois possibilita uma versatilidade em diversas condições operacionais (reações foras da sua naturalidade, como condições drásticas de pH e temperatura e catálise de uma grande variedade de substratos (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

Alguns dos principais fungos produtores de lipase são do gênero *Mucor*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Rhizomucor*, *Aspergillus*, *Thermomyces*, *Candida*, *Bacillus*, *burkholderia cepacia*, *pseudomonas* e *Penicillium*, sendo suas lipases empregadas em diversos setores industriais (SINGH; MUKHOPADHYAY, 2012).

O uso das lipases é muito abrangente, no entanto, a sua utilização na forma livre pode trazer algumas desvantagens que devem ser levadas em consideração para sua aplicação em escalas industriais, tais como dificuldade de reutilização e consequente aumento do custo do processos, e a perda de sua atividade catalítica devido à baixa estabilidade da lipase no meio reacional (MOHAMAD *et al.*, 2015; ZHAO *et al.*, 2015). Entretanto, essas adversidades podem ser minimizadas ao se imobilizar as enzimas em suportes. A síntese de biocatalisadores heterogêneos utilizando suportes hidrofóbicos possibilita as lipases uma estabilização na sua forma mais ativa, o que promove um efeito positivo na estabilidade e um aumento da atividade enzimática (BERNAL; RODRÍGUEZ; MARTÍNEZ, 2018; BILAL; IQBAL, 2019; SHEMSI *et al.*, 2019).

2.3 Imobilização de lipases

A imobilização de qualquer tipo de enzima vem sendo primordial nos últimos anos, a fim de melhorar as propriedades enzimáticas, e obter melhores resultados em períodos de tempo reduzidos. (BILAL *et al.*, 2018).

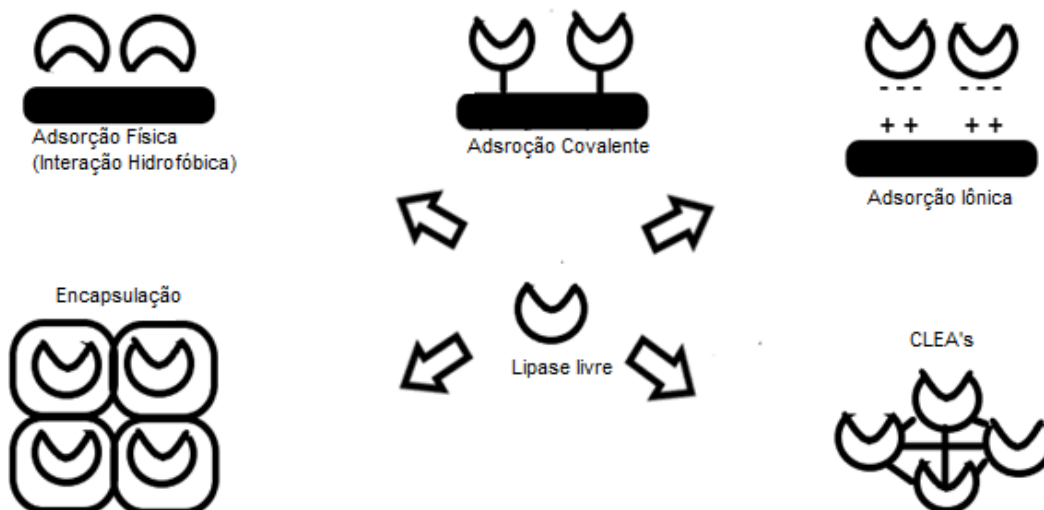
O suporte que será escolhido para a imobilização deve preencher alguns requisitos para minimizar o máximo possível, a perda da atividade enzimática e a diminuição na taxa de reação quando comparado à enzima livre (BASSO; SERBAN, 2019).

- Possuir um custo reduzido e ser não nocivo ao meio ambiente.
- Ser capaz de carregar uma grande quantidade de enzima, porém o diâmetro dos poros devem permanecer em tamanhos um pouco maiores que o diâmetro médio das proteína (HARTMANN; KOSTROV, 2013; MAGNER, 2013).
- Possuir uma superfície hidrofóbica, que no caso da lipase, representa um microambiente favorável para melhorar as características catalíticas das enzimas imobilizadas (RODRIGUES *et al.*, 2013).
- Possibilitar a funcionalização e/ou ativação, apresentando o mínimo de impedimento estérico.

- Ser inócuo e não reativo para não interferir na reação desejada.
- Apresentar resistência microbiana para a viabilidade comercial da enzima.
- Possuir uma boa resistência térmica e mecânica além de sua resistência a abrasão e pressão de fluxo, possibilitando sua utilização em diferentes condições operacionais.
- Possuir durabilidade química.

Muitos métodos foram desenvolvidos para a otimização dos processos de imobilização, e são classificadas em três classes; as enzimas imobilizadas em suportes sólidos, a reticulação e o aprisionamento. Dependendo do tipo de ligação essa imobilização poderá ser considerada reversível ou irreversível, sendo as ligações iônica ou covalente, e do aprisionamento; processos híbridos de adsorção física com posterior reticulação e adsorção física como representa a figura 2.

Figura 2 - Diferentes métodos de imobilização



Fonte: do autor.

Na imobilização por ligação iônica, as enzimas se ligam ao suporte que contenha íons residuais pela atração de íons com cargas opostas presentes em sua superfície. Essa interação suporte/enzima é bem mais forte comparado com a adsorção física e mais amenas que as ligações covalentes, seu método de operação é conduzido em processos mais amenos. Portanto, essa imobilização causa menos alterações na conformação e no sitio ativo das lipases, mantendo uma boa atividade na maioria dos casos, mas podendo ocorrer uma dessorção quando os meios de reação possuem a presença de substratos de alta força iônica (MENDES *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2015).

O processo de imobilização por ligação covalente é um método irreversível onde acontece reação entre grupos nucleofílicos da enzima com grupos eletrofílicos do suporte. Resulta em uma força de ligação muito forte entre a lipase e o suporte, apresentando uma alta estabilidade e evitando lixiviações, favorecendo o uso das lipases em condições de temperaturas e pH extremas. No entanto suas condições de preparo são rigorosas, podendo se utilizar reagentes tóxicos, tornando os custos mais elevados (ABDULLA; SANNY; DERMAN, 2017).

A imobilização por aprisionamento se baseia na captura das enzimas em uma rede de polímeros que permite a passagem de substratos e produtos, mas retém as enzimas. Após o aprisionamento, as lipases não são ligadas ao suporte, mas sua difusão é restrita, sendo uma técnica simples de se usar, se comparada a imobilização covalente (BADGUJAR *et al.*, 2017).

O processo de imobilização por reticulação se dá pela formação de reticulações intermoleculares, isso ocorre quando é adicionado um reagente de reticulação ou multifuncional. Esta é uma técnica isenta da utilização de suportes, na qual são formados complexos enzimáticos, obtendo-se estruturas tridimensionais, proporcionando uma diminuição nos custos e uma alta atividade e concentração de atividade enzimática no catalizador. Algumas estratégias frequentemente estudadas são a reticulação sobre a enzima solúvel (CLE), reticulação sobre cristais enzimáticos (CLECs), e agregados sobre a enzima (CLEAs) (NURALIYAH; WIJANARKO; HERMANSYAH, 2018).

O método mais utilizado de imobilização de lipases até o presente momento é a adsorção física, pois esse método possibilita uma grande variedade de técnicas, por ser o mais simples e pelo fato de retirarmos algumas desvantagens de outros tipos de imobilização, como a reutilização do suporte depois da dessorção da enzima do mesmo por exemplo, algo que é vantajoso visando uma escala industrial. A imobilização de lipases pelo seu mecanismo específico de ativação interfacial em suportes hidrofóbicos possibilita mais vantagens do que se imobilizar enzimas em suportes de superfície não hidrofóbica (BASSI *et al.*, 2016; LAGE *et al.*, 2016). A imobilização de lipases em suportes hidrofóbicos é devido a sua ativação interfacial e neste mecanismo a área superficial do sítio ativo da lipase se encontra mais exposta, pois a estrutura da parte hidrofóbica, a chamada “tampa”, está aberta, o que melhora a atividade catalítica da lipase imobilizada (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998). As lipases possuem uma característica não comum entre as enzimas, o fato de poder ser

super ativada e em sua conformação aberta em meios hidrofóbicos, exclui a abertura da mesma por fatores externos como algum reagente ou solvente orgânico (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2016)

Comparado com as outras metodologias, a adsorção física trás diversos benefícios tais como; utilização de condições de processos mais amenos e fáceis, custos de materiais reduzidos, possível retirada do biocatalisador para sua reciclagem e uma alta recuperação de atividade enzimática.

Na Tabela 1 estão mostradas diferentes metodologias de imobilização com as mais variadas fontes de lipase. É possível verificar a diversidade de aplicações das lipases tanto na escala laboratorial, quando nos estudos já aplicados em escalas industriais.

Tabela 1 - Metodologias de imobilização e suas diversas aplicações:

(continua)

Fonte de lipase	Método de imobilização	Suporte	Condições de imobilização	Aplicação	Referências
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção (covalente)	Orgânico - Membrana de casca de ovo	Glutaraldeído - - pH 7- 50 mM 400µg/ml/g suporte	Hidrolise de óleo de oliva	(ABDULLA; SANNY; DERMAN, 2017)
		Orgânico - Casca de arroz	glutaraldeído -pH 8 -50mM - 300 µg /ml/g suporte		
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Nanofios de sílica com cobertura de grupos octadecil	Glutaraldeído pH 8 – 50 mM – 200 mg de enzima bruta	Transesterificação de 1-feniletanol racêmico com acetato de vinila	(JIN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Reticulação	Inorgânico - sílica funcionalizado via incorporação de β-ciclodextrina	Epicloridrina – pH 7 – 100mM- 1:5 g de enzima g suporte	Transesterificação do óleo de palmiste com etanol	(MARTIN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Sílica mesoporosa ordenada com fenil modificada	pH 7 – 50 mM – 1 a 7 mg/mL de lipase	Resolução de 1-feniletanol	(ZHENG <i>et al.</i> , 2017)
<i>Candida rugosa</i>	Reticulação	Orgânico – Casca de milho	Glutaraldeído – pH 7,5 – 100mM- 0,75 mg/ml/g suporte	Hidrólise do óleo de oliva	(NURALIYAH; WIJANARKO; HERMANSYAH, 2018)

Tabela 1 - Metodologias de imobilização e suas diversas aplicações:

(continua)

Fonte de lipase	Método de imobilização	Suporte	Condições de imobilização	Aplicação	Referências
<i>Candida rugosa</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Sílica mesoporosa com Nanopartículas octadecilalquil	- pH 7,4 - 100 mM - 1 mg/mL/g de suporte	Hidrólise do palmitato de 4-nitrofenilo	(KALANTARI <i>et al.</i> ., 2017)
<i>Candida sp.99-125</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Ciclomatriz de polifosfazeno funcional	pH 7 - 50 mM - 2,5 mg/mL/g suporte	Hidrólise do triacetato de glicerol	(CHEN <i>et al.</i> ., 2016)
<i>Candida antarctica</i> e <i>Candida rugosa</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Orgânico - Nanopartículas de sílica modificadas por ácido esteárico	Ácido carboxílico - 5 e 25 mg de enzima - pH 7 - 100 mM	Reação de glicerólise usando azeite	(SINGH; MUKHOPADHYAY, 2018)
<i>Candida antarctica</i> (CaLB)	Adsorção (covalente)	Orgânico - Casca de arroz	Glutaraideído - pH 7 - 50 mM - 7,4 mL de enzima	Hidrólise do óleo de oliva	(CORICI <i>et al.</i> ., 2016)
<i>Candida antarctica</i> (CaLB)	Reticulação	Orgânico - Casca de arroz	Glutaraideído - pH 7 - 100 mM - 570g/ L de solução	Síntese de g-policaprolactona	(ULKER; GOKALP; GUVENILIR, 2016)
	Adsorção (covalente)		Glutaraideído - pH 7 - 100 mM - 570g/L		
<i>Candida antarctica</i> (CaLB)	Aprisionamento	Inorgânico - Nanopartículas de poli (ureia-uretano)	MNPs-AO - pH 7,6 - 100 mM - 2mg/mL/g suporte	Síntese de oleato de geranilo e propionato de geranilo	(CHIARADIA <i>et al.</i> ., 2016)
<i>Candida antarctica</i> (CaLB)	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - polímero	p-NPL - pH 7 - 5 mM - 10 ml de enzima/g suporte	Esterificação de ácidos graxos de palma e de soja	(CIPOLATTI <i>et al.</i> ., 2018)
<i>Candida antarctica</i> (CaLB)	Adsorção (covalente)	Inorgânico - nanopartículas de organossilica	glutaraldeído pH 7 - 100 mM - 1 ml de enzima	Esterificação de ácido levulínico e álcool n-laurílico	(JIANG <i>et al.</i> ., 2019)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Mesoporous poly-methacrylate particles	Glutaraldeído - pH 7 - 5 mM - 0,21 mg/mL	Síntese de um éster lubrificante: oleato de n-octilo	(BASSI <i>et al.</i> ., 2016)

Tabela 1 - Metodologias de imobilização e suas diversas aplicações:

(continua)

Fonte de lipase	Método de imobilização	Suporte	Condições de imobilização	Aplicação	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Purolite C18 (metacrilato de octadecil)	CTAB - pH 7 – 100 mM 2 mg/mL em 10 g de suporte	Etanólise de óleo de girassol	(ABREU SILVEIRA <i>et al.</i> , 2017)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Purolite macroporoso C-18, mesoporoso Sepabeads C-18	CTAB – pH 7 100 mM - 20 mg TLL em 10 g suporte	Etanólise de óleo de girassol	(ABREU SILVEIRA <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - octadecil metacrilato, (metacrilato de octadecil), (estireno) e polímero metacrílico)	pH 7 5 mM - 0,5 mg/mL/ g suporte–	Produção de biodiesel	(TACIAS-PASCACIO <i>et al.</i> , 2017)
<i>Thermomyces lanuginoso</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Polímero (Diaion® HP 2-MG)	pH 7 – 5 mM – 5 a 200 mg de proteína/ g suporte	Síntese de oleato de isoamil (biolubrificante)	(LAGE <i>et al.</i> , 2016)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico- Metacrilato de octadecil	pH 7 – 5 mM – 0,25 mg/mL	Síntese de glicerídeos parciais de ácido linoléico conjugado via Esterificação do glicerol	(VERDASCO-MARTÍN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Aprisionamento	Inorgânico - hidroxipropil metilcelulose e quitosana	Ácido acético 30 a 80 mg/mL – pH 8 – 100 mM	Síntese de dodecanoato de butilo	(BADGUJAR <i>et al.</i> , 2017)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Orgânico - Casca de arroz	pH 7,5 – 5 mM enzima com atividade de 90 a 1800 U/mL	Produção de biodiesel	(BONET-RAGEL <i>et al.</i> , 2018)
<i>Cercospora kikuchii</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Orgânico - Fibra de coco	p-NPP – pH 6,5 – 50 mM – 5 mg/ml	Hidrolise de óleo de oliva	(COSTA SILVA <i>et al.</i> , 2015)
Lipase pancreática de porco	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânica – Sílica revestida com grupos octilo	Tolueno pH 7 – 5 mM - 0,543 mg/ mL/ g supрте	Síntese de ésteres de ácidos graxos da D-xilose	(VESCOVI; DOS SANTOS; TARDIOLI, 2017)

Tabela 1 - Metodologias de imobilização e suas diversas aplicações:

					(conclusão)
Fonte de lipase	Método de imobilização	Suporte	Condições de imobilização	Aplicação	Referências
<i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Alcaligenes sp.</i> e <i>Candida</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Inorgânico - Sepabeads C-18	pH 7 – 10 mM - 5 mg de lipase	Transesterificação do éster etílico do ácido docosaheptaenóico com glicerol	(MORENO-PEREZ <i>et al.</i> , 2018)

Fonte: do autor

2.4 Suporte para imobilização de lipases

Como visto na Tabela 1, diferentes tipos de suporte podem ser empregados. Os materiais orgânicos como agarose quitosana, alginato vem chamando atenção como promissores suportes, já os inorgânicos como sílicas porosas e silicatos também partilham da mesma possibilidade (BEZERRA *et al.*, 2015; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014). Tanto os materiais orgânicos quanto os inorgânicos devem ter as mesmas características para sua aplicação nos setores industriais, como o custo reduzido, a não toxicidade ao meio ambiente, porosidade adequada para um carregamento vantajoso, hidrofobicidade da superfície, não interação na reação desejada, duração e a possibilidade de ser usada em diferentes condições (BASSO; SERBAN, 2019).

Muitos trabalhos na literatura relataram a síntese de diferentes suportes visando alcançar uma imobilização bem sucedida na qual se geraria um ambiente com uma baixa força iônica a fim de mudar o equilíbrio da conformação do sítio ativo da lipase de fechado para aberto, favorecendo a síntese catalítica (MANOEL *et al.*, 2015a; VIRGEN-ORTÍZ *et al.*, 2017).

Suporte inorgânicos a base de sílica, alumina, titânia, zircônia, cerâmica, magnética, entre outros, se destacaram por permitir uma maior estabilidade da lipase imobilizada diante de solventes orgânicos, possuírem uma alta área superficial em relação aos tamanhos de poros e ótimas propriedades mecânicas (GHOLAMZADEH; MOHAMMADI ZIARANI; BADIEI, 2017). Os suportes a base de sílica são os suportes inorgânicos mais utilizados na preparação de biocatalisadores, podendo ser obtidos de diferentes fornecedores sintetizados pela técnica sol-gel, usando diferentes precursores de alcoxissilanos ou preparados por processos termoquímicos utilizando resíduos orgânicos da agroindústria. Os suportes podem ser vendidos com ou sem a enzima imobilizada, a Merck, Chiral Vision são exemplos de empresas que tem catálogos contendo informações como o tamanho dos poros do suporte, de que

material é feito, qual enzima é imobilizada, valor por quantidade, entre outras informações.

A síntese de suportes heterofuncionais é uma estratégia para imobilização de lipases onde o problema da dessorção das enzimas é minimizado ou quase extinto, pois utiliza duas metodologias para contornar essa adversidade, a primeira com uma imobilização via adsorção interfacial e posteriormente uma modificação dos grupos químicos, introduzindo alguns grupamentos, promovendo assim novas interações enzimáticas (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Uma maneira de sintetizar sistemas que sejam eficientes e confiáveis contra a lixiviação de enzimas em processos de imobilização por adsorção é a incorporação de porções orgânicas na superfície sólida de suportes, o que permite o estabelecimento de ligações covalentes estáveis (LIU *et al.*, 2012). O suporte de sílica é geralmente tratado com aminoalquiltriétoxissilanos, com a finalidade de introduzir grupamentos amino, com posterior ativação com agentes como glutaraldeído, cloreto, ácido cianúrico e cloreto de magnésio, com a função de introduzir funcionalidade que reage com os grupamentos na superfície da enzima (BANJANAC *et al.*, 2016).

A síntese desses materiais mesoporosos é realizada com uma fonte de sílica com a ancoragem de grupamentos funcionais, que podem ser alcançados por três rotas principais, com silanos funcionalizados, co-condensação de silano com a sílica e pós enxerto a sílica (DA'NA, 2017).

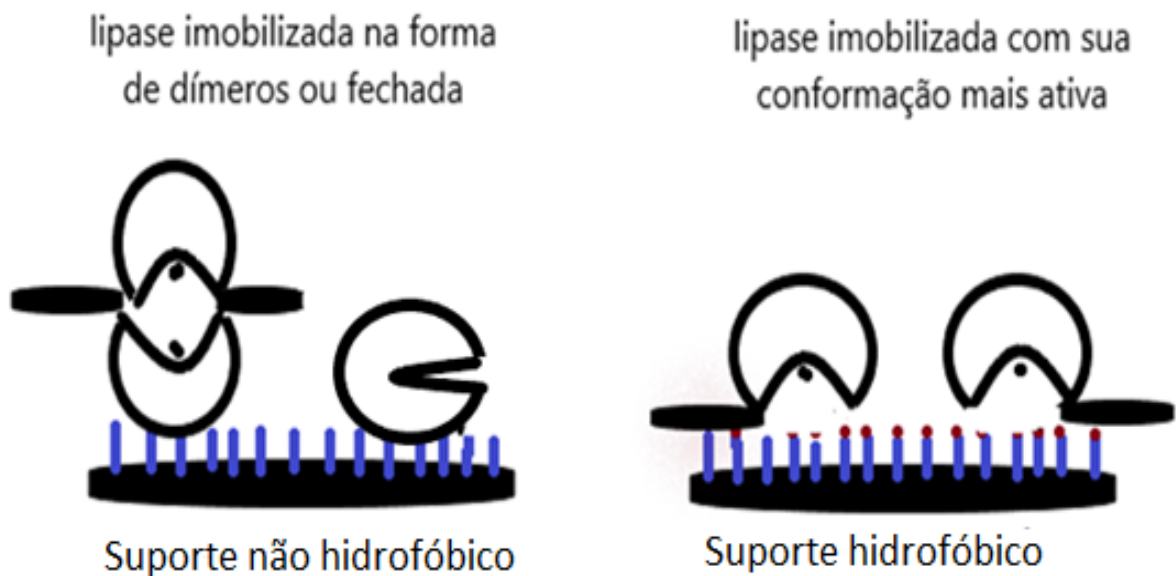
Vários colaboradores no decorrer dos anos vêm sintetizam esses materiais. Em 1990, Kuroda *et al.* (YANAGISAWA *et al.*, 1990) uma sílica mesoporosa com distribuição uniforme do tamanho dos poros (FSM-16). Em 1992, os cientistas da Mobil desenvolveram uma sílica rotulada como M41S e MCM-41 e MCM-48 (BECK *et al.*, 1992). Em 1995, Tanev e Pinnavaia com sílica mesoporosa de formato hexagonal (HMS). Em 1998, (ZHAO *et al.*, 1998) descreveu a síntese de Santa Barbara Amorphous (SBA-15), que é um dos materiais mesoporosos mais promissores até os dias atuais.

2.5 Imobilização de lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos

A maioria das lipases possuem uma estrutura de cadeia polipeptídica, com faces hidrofílicas e hidrofóbicas (BRZOZOWSKI *et al.*, 1991; GROCHULSKI *et al.*, 1993). A lipases tem uma maior exposição ao meio reacional e conseqüentemente uma maior ativação quando ela se encontra em sua forma da tampa aberta, quando

essa face hidrofóbica tem a possibilidade de fazer interações com um meio que tenha a presença de outras estruturas hidrofóbicas (figura 3). Quando há a presença de um suporte hidrofóbico, a enzima se liga ao mesmo, ficando em uma conformação com seu centro ativo exposto, o que possibilita um aumento considerável da sua atividade (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Figura 3 – Possíveis mecanismos de imobilização de lipases em diferentes suportes



Fonte do autor.

O método de imobilização por ativação nos traz vantagens como uma alta imobilização das lipases na forma aberta, superativada e monomérica, porém essa tendência das lipases em se adsorverem em superfícies hidrofóbicas pode acarretar problemas como a formação de dímeros de lipase, que é o resultado das lipases em sua conformação aberta mas que ainda não se encontram fixadas na superfície do suporte, assim as formas monoméricas podem se agregar, o que forma essas estruturas chamadas dímeros de lipase. As lipases também podem ser adsorvidas em outras proteínas do estrato assim como algum produto gerado na reação de escolha que possa vir a competir pelo sítio ativo com o substrato, o que causa uma diminuição do rendimento da reação (MANOEL *et al.*, 2015b; ZHANG *et al.*, 2017). Em suma, a estrutura e propriedades do suporte, pode condicionar as propriedades finais da lipase (TACIAS-PASCACIO *et al.*, 2016).

Nem todas as lipases tem a possibilidade de se imobilizar com um alto rendimento de imobilização em suportes muito hidrofóbicos, neste caso, um suporte menos hidrofóbico seria uma escolha correta para a imobilização dessas lipases. De um modo geral, o suporte mais hidrofóbico pode imobilizar as lipases que são menos hidrofóbicas, o que permite fracionar as misturas de estratos enzimáticos em função da afinidade pelo suporte (BRABCOVÁ *et al.*, 2013).

2.6 Aplicação de lipases imobilizadas em síntese de ésteres

Os ésteres são importantes compostos orgânicos formados por álcoois com tamanhos de cadeia variados e ácidos carboxílicos. A síntese de ésteres é considerada promissora para a substituição de óleos minerais no cenário da produção de biodiesel e biolubrificantes, sua produção pode ser realizada via química ou enzimática. É amplamente usado nas indústrias de cosmética, farmacêutica e lubrificante. Quando produzidas por rota enzimática há a geração de compostos com alto valor agregado (BASSI *et al.*, 2016; LIMA; PERES; MENDES, 2018).

Biolubrificantes são lubrificantes biodegradáveis, não tóxicos e advindos de fontes renováveis como óleos vegetais e gordura animal. Nos dias atuais a maioria dos lubrificantes utilizados são de fontes não renováveis, o que mostra a atual preocupação em sintetizar novos lubrificantes que sejam baseados em uma química mais sustentável (REEVES; SIDDAIAH; MENEZES, 2017).

Atualmente a produção de biolubrificantes utiliza principalmente a transesterificação, empregando lipases, podendo converter triglicerídeos de cadeia longa em ésteres alquílicos de ácidos graxos.

Os biolubrificantes podem ser produzidos por outras rotas além da transesterificação, como a hidrogenação e epoxidação, rotas essas que foram compiladas na Tabela 2 contendo diferentes exemplos de aplicação de lipases imobilizadas em síntese de biolubrificantes (ZHONG *et al.*, 2020).

As reações citadas podem ser de uma variedade de substratos, os óleos vegetais são geralmente classificados como comestíveis e não-comestíveis. Os óleos vegetais usados para produção de biolubrificantes podem variar de país para país por motivos geográficos e climáticos. No cenário brasileiro, existem algumas oleaginosas que são produzidos em grandes escalas, como a soja, dendê, coco e pinhão manso, sendo a produção de soja em escalas muito maior que as demais citadas, tendo uma

produção de 124,85 milhões de toneladas, tornando o Brasil o maior produtor deste grão em todo o mundo (EMBRAPA SOJA, 2020).

Uma estratégia que vem sendo bastante empregada para a produção de biolubrificantes é a esterificação, ela é uma metodologia que se dá após as reações de hidrólise. É uma alternativa vantajosa pelo fato de superar uma desvantagem associada na recuperação de um produto, o glicerol, sendo os ácidos graxos a principal matéria prima. A esterificação se mostra favorável pela sua utilização em ambientes amenos de pressão e temperatura, seguida de algumas horas para a conversão de ácidos graxos em ésteres, sendo o tempo gasto na conversão um fator que se deseja diminuir. Na tabela abaixo (Tabela 2), observa-se essa abrangência.

Tabela 2 - Lipases imobilizadas para a produção de biolubrificantes

(continua)

Fonte de lipase	Protocolo de imobilização	Suporte	Éster produzido	Condições reacionais	Tempo de reação (reuso)	Referências
<i>Candida Rugosa</i> (heterogênea)	Adsorção (hidrofóbica)	Accurel MP1000 (PP)	éster de polioliol	ácido graxo livre/polioliol 3,75:1 – 40°C - 24 horas – 1% de biocatalisador	6 ciclos sem modificações significativas	(CAVALCANTI <i>et al.</i> , 2018)
<i>Candida Rugosa</i>	Adsorção (hidrofóbica)	poli (metacrilato de metilo)	Ésteres de álcoois neopentil glicol	Ácido graxo/álcool 3,75:1 fração molar 60°C – 2 horas 4% de biocatalisador -	Não houve teste de reuso	(FERNANDES <i>et al.</i> , 2020)
<i>Candida antarctica</i>	Adsorção (covalente)	Nanopartículas Magnéticas Revestidas com Quitosana	Ésteres de óleo de tilápia	óleo de tilápia e 2-etil-1-hexanol fração molar 1:1 – 30°C – 200 rpm – 24 horas – 2% de biocatalisador	Não houve teste de reuso	(MONTEIRO <i>et al.</i> , 2019)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofóbica)	poli-metacrilato	oleato de isoamilo	álcool isoamílico/ácido oleico na razão (1: 1)- 45°C – 20% m/v de biocatalisador	20 ciclos sem modificações significativas	(LAGE <i>et al.</i> , 2016)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Casca de arroz	estearato de butilo	Ácido esteárico/álcool butílico 1:1 – 240 rpm – 50°C – 0,1 g de enzima imobilizada	6 ciclos sem modificações significativas	(BOLINA <i>et al.</i> , 2018)

Tabela 2 - Lipases imobilizadas para a produção de biolubrificantes

(conclusão)

Fonte de lipase	Protocolo de imobilização	Suporte	Éster produzido	Condições reacionais	Tempo de reação (reuso)	de	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Adsorção (hidrofobia)	Lewatit VP OC 1600	triéster de trimetilolpropano	ácido adípico/ ácool isononílico razão molar de 1: 3 – 50°C – 250 rpm – 2 horas – 10% de carga enzimática (com base no peso total do substrato)	Não teste reuso	houve de	(LEE <i>et al.</i> , 2019)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção (hidrofóbica)	sílica-hidroxiethylulose de matriz epóxi	Ésteres isoamílicos e alquílicos de óleo Fusel	Óleo de palme/ ácool isoamílico fração molar 1:4 - 8 horas – 45°C - 150 rpm – 200 mg/g suporte	Não teste reuso	houve de	(CERÓN <i>et al.</i> , 2018)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção (covalente)	Óxido de nióbio	ésteres alquílicos	Óleo/ácool 1:8 – 45°C – 150 rpm – 96 horas 150 rpm – 10% de enzima	Não teste reuso	houve de	(DA SILVA <i>et al.</i> , 2020)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Reticulação	Partículas de alginato	Ésteres isoamílicos	ácido acético e ácool isoamílico razão molar de 0,5 – 150 rpm – 37°C – 24 horas- 30% de lipase imobilizada	Não teste reuso	houve de	(PADILHA; TAMBOURGI; ALEGRE, 2018)
<i>Candida antarctica</i> e <i>Rhizomucor miehei</i>	Adsorção (hidrofóbica)	Duolite ES 562	ésteres de neopentil glicol	Biodiesel/ NPG 3,75:1 – 40°C - 24 horas – 4% de enzima	Não teste reuso	houve de	(AGUIEIRAS <i>et al.</i> , 2020)

Fonte: do autor

Em geral os lubrificantes de base biológica são produtos com baixa toxicidade e excelente biodegradabilidade, uma melhor lubrificação, bons índices de viscosidade e resistência ao desgaste, associada a utilização da catálise enzimática vem mostrando bons resultados para a produção de biolubrificantes adequados com as normas técnicas, sendo este o objetivo de toda e qualquer nova formulação, a melhora do desempenho e das propriedades físico-químicas do mesmo (CHAN *et al.*, 2018).

2.1.7 Matéria prima

Uma boa parte do território brasileiro é destinado para a produção agrícola e agropecuária sendo que uma grande quantidade desse espaço é preenchida com

fazendas de grande extensão para produção animal e latifúndios, de onde o país tira sua maior fonte de renda, tornando o Brasil um país agroexportador.

O Brasil é um dos primeiros em relação à exportação/produção de algumas commodities, como carne bovina, suína, aves, cana-de-açúcar, café, soja, entre outros (EMBRAPA, 2021). Em 2020 o Brasil se tornou o maior produtor de soja na safra 2019/2020 e também o maior exportador, chegando a uma produção de 124,845 milhões de toneladas, em uma área plantada de 36,950 milhões de hectares, segundo os dados disponíveis pela CONAB em setembro de 2020. (EMBRAPA SOJA, 2020).

Os óleos vegetais são constituídos por diferentes ácidos graxos em diversas concentrações, sendo o ácido linoleico, o ácido graxo majoritário na composição do óleo de soja, com aproximadamente 56%, além do ácido palmítico, esteárico, oléico e linolênico (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

A maior parte da soja produzida no Brasil é destinada para a fabricação de óleo e de farelo, além dessas aplicações ela pode ser utilizada também em cosméticos, fármacos, veterinária, adubo, plástico, entre outras, entretanto, a sua maior utilização é destinada para a alimentação humana e animal e na produção de biocombustíveis.

Como a produção de soja é em sua maior parte destinada para o óleo refinado, infere-se que haja uma geração elevada de subprodutos, que é considerado um resíduo todo produto resultante de algum processo de transformação ou processamento, mesmo que esse resíduo possa ser reutilizado como o óleo resultante da fritura de alimentos (óleo residual). Assim, o seu descarte inadequado poder causar relevantes impactos ambientais (LIU *et al.* 2020; MANSIR *et al.* 2018).

Apesar dos impactos negativos gerados pelo descarte inadequado desse tipo de resíduo (óleo residual), algumas alternativas para um melhor aproveitamento desse óleo residual vêm impulsionando diversas pesquisas para a utilização do mesmo em reações para a síntese de produtos. Este estímulo é decorrente da atual necessidade de se priorizar processos que possibilitem uma rota menos agressiva ao meio ambiente e aos operadores, sendo um dos principais pilares da química mais sustentável (SOJI-ADEKUNLE *et al.* 2019).

O óleo de cozinha residual vem sendo muito empregado para a produção de biodiesel (COSTA *et al.*,2020; MANSIR *et al.* 2018), e recentemente sua aplicação para a síntese de biolubrificantes vem se destacando no cenário mundial em substituição aos obtidos de fontes fósseis (HUSSEIN *et al.*, 2021; SOUFI *et al.* 2019).

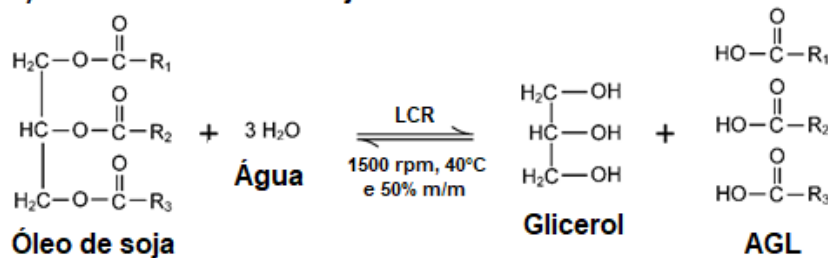
Os biolubrificantes, atualmente produzidos, podem ser obtidos de vários

triacilglicerídeos advindos de diferentes óleos vegetais, e sua síntese pode ser realizada por diversas rotas (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Uma rota que vem ganhando destaque é a hidroesterificação, como mostra na figura 4, na qual a reação de hidrólise do óleo vegetal vem seguida da reação de esterificação dos ácidos graxos livres produzidos com alto teor de álcool ou poliol (GRECO_DUARTE *et al.*, 2017; PAPADAKI *et al.*, 2018).

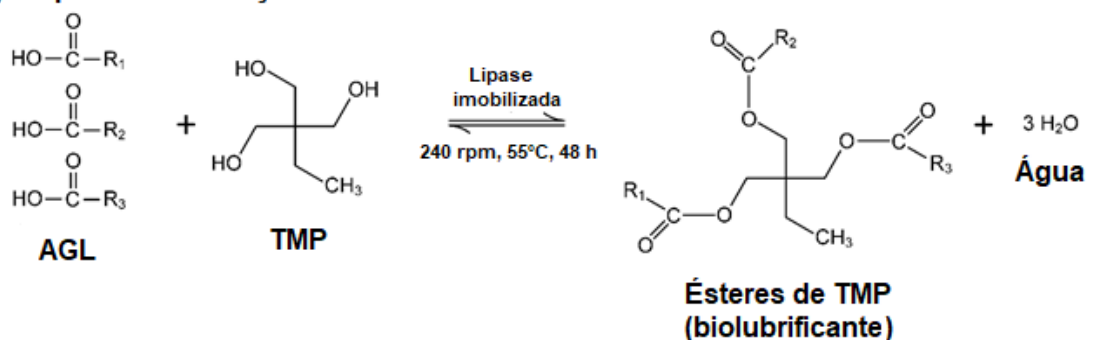
Um aumento na estabilidade desse produto é alcançado quando a porção glicerol do óleo é substituída por um poliol com átomo de carbono quaternário, como é o exemplo do trimetilolpropano (TMP), que é atualmente o éster de poliol mais disponível comercialmente no mercado, como mostra o esquema da figura 4 (CAVALCANTE *et al.* 2018).

Figura 4 – Esquema representativo da produção de biolubrificante (ésteres de TMP) por sequencial hidrólise do óleo de soja e esterificação.

A) Hidrólise do óleo de soja



B) Etapa de esterificação



Fonte: do autor

Essa modificação torna muito atraente a produção de biolubrificantes, utilizando um composto majoritário considerado resíduo (óleo residual), com o poliol TMP, juntamente com uma rota que possibilita a aplicação de biocatalisadores, podendo ser estes hetero ou homogêneos, o que torna muito atrativo (CAVALCANTE *et al.* 2018).

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, R.; SANNY, S. A.; DERMAN, E. Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 206, n. 1, 2017.
- ABED, S. M. *et al.* Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. **Lwt**, v. 93, p. 306–315, 2018.
- ABREU SILVEIRA, E. *et al.* Modulation of the regioselectivity of *Thermomyces lanuginosus* lipase via biocatalyst engineering for the ethanolysis of oil in fully anhydrous medium. **BMC Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2017.
- ABREU SILVEIRA, E. *et al.* Biocatalyst engineering of *Thermomyces lanuginosus* lipase adsorbed on hydrophobic supports: Modulation of enzyme properties for ethanolysis of oil in solvent-free systems. **Journal of Biotechnology**, v. 289, p. 126–134, 2019.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406–6436, 2013
- AGUIEIRAS, E. C. G. *et al.* Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574–581, 2019.
- AGUIEIRAS, É. C. G. *et al.* Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials. **Renewable Energy**, v. 148, p. 689–696, 2020.
- ALLIE MARKET RESEARCH. Enzymes Market Type (Protease, Carbohydrase, Lipase, Polymerase and Nuclease, and Other Types), Source (Microorganisms, Plants, and Animals), Reaction Type (Hydrolase, Oxidoreductase, Transferase, Lyase, and Other Reaction Types), and Application (Food and Beverages, Household Care, Bioenergy, Pharmaceutical and Biotechnology, Feed, and Other Applications) - Global Opportunity Analysis and Industry Forecast, 2020–2027. Portland, 2020. Disponível em: <https://www.alliedmarketresearch.com/enzymes-market>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- ALVES, M. D. *et al.* Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. **Chemical Engineering Journal**, v. 311, p. 1–12, 2017.
- 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.
- ANGULO, B. *et al.* Comparison of chemical and enzymatic methods for the transesterification of waste fish oil fatty ethyl esters with different alcohols. **ACS Omega**, v. 5, n. 3, p. 1479–1487, 2020.
- BADGUJAR, V. C. *et al.* Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on a polymeric film for synthesis of important fatty acid esters: kinetics and application studies. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 10, p. 1463–1478, 2017.

- BAHADI, M. *et al.* Optimization of response surface methodology by D-optimal design for synthesis of food-grade palm kernel based biolubricant. **Industrial Crops and Products**, v. 139, n. April, 2019.
- BANJANAC, K. *et al.* Cyanuric chloride functionalized silica nanoparticles for covalent immobilization of lipase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 91, n. 2, p. 439–448, 2016.
- BARSÉ, L. Q. *et al.* Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 389–397, 2019.
- BASSI, J. J. *et al.* Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900–909, 2016.
- BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, n. September, p. 110607, 2019.
- BAUWELINCK, J. *et al.* Investigation of the enzyme-catalysed transesterification of methyl acrylate and sterically hindered alcohol substrates. **ChemistrySelect**, v. 3, n. 18, p. 5169–5175, 2018.
- BECK, J. S. *et al.* A new family of mesoporous molecular sieves prepared with liquid crystal templates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n. 27, p. 10834–10843, 1992.
- BERNAL, C.; RODRÍGUEZ, K.; MARTÍNEZ, R. Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 5, p. 1470–1480, 2018.
- BEZERRA, C. S. *et al.* Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 132, n. 26, p. 1–15, 2015.
- BILAL, M. *et al.* “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 278–290, 2018.
- BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Tailoring multipurpose biocatalysts via protein engineering approaches: A review. **Catalysis Letters**, v. 149, n. 8, p. 2204–2217, 2019.
- BOLINA, I. C. A. *et al.* Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 2354–2365, 2018.
- BOLINA, I. C. A.; GOMES, R. A. B.; MENDES, A. A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. **Bioenergy Research**, 2021.
- BONET-RAGEL, K. *et al.* Rice husk ash as a potential carrier for the immobilization of lipases applied in the enzymatic production of biodiesel. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 2, p. 151–158, 2018.

BORNSCHEUER, U. T. *et al.* Directed evolution empowered redesign of natural proteins for the sustainable production of chemicals and pharmaceuticals.

Angewandte Chemie - International Edition, v. 58, n. 1, p. 36–40, 2019.

BRABCOVÁ, J. *et al.* Highly selective purification of three lipases from *Geotrichum candidum* 4013 and their characterization and biotechnological applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 98, p. 62–72, 2013.

BRZOZOWSKI, A. M. *et al.* A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. **Nature**, 1991.

CAO, C.; MATSUDA, T. Biocatalysis in organic solvents, supercritical fluids and ionic liquids. **Organic synthesis using biocatalysis**, v. 1, p. 67–97, 2016.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

CASTILLA, I. A. *et al.* Harnessing marine biocatalytic reservoirs for green chemistry applications through metagenomic technologies. **Marine Drugs**, v. 16, n. 7, p. 1–21, 2018.

CAVALCANTI, E. D. C. *et al.* Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, v. 215, n. Nov. 2017, p. 705–713, 2018.

CERÓN, A. A. *et al.* Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, n. Mar. p. 166–172, 2018.

CHAN, C. H. *et al.* Tribological behavior of biolubricant base stocks and additives. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 93, n. March, p. 145–157, 2018.

CHEN, C. *et al.* Immobilization of lipase onto functional cyclomatrix polyphosphazene microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 132, p. 67–74, 2016.

CHIARADIA, V. *et al.* Immobilization of *Candida antarctica* Lipase B on Magnetic Poly(Urea-Urethane) Nanoparticles. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 180, n. 3, p. 558–575, 2016.

CHOJNACKA, A.; GŁADKOWSKI, W. Production of structured phosphatidylcholine with high content of myristic acid by lipase-catalyzed acidolysis and interesterification. **Catalysts**, v. 8, n. 7, 2018.

CIPOLATTI, E. P. *et al.* 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. 46727, p. 1–13, 2018.

CORICI, L. *et al.* Large scale applications of immobilized enzymes call for sustainable and inexpensive solutions: Rice husks as renewable alternatives to fossil-based organic resins. **RSC Advances**, v. 6, n. 68, p. 63256–63270, 2016.

COSTA, M. J. *et al.* Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 157, n. June, p. 108131, 2020.

- COSTA SILVA, T. A. *et al.* Drying of enzyme immobilized on eco-friendly supports. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 44, p. 3019–3026, 2015.
- CRUZ, M. *et al.* Enzymatic esterification of acid oil from soapstocks obtained in vegetable oil refining: Effect of enzyme concentration. **Renewable Energy**, v. 124, p. 165–171, 2018.
- DA'NA, E. Adsorption of heavy metals on functionalized-mesoporous silica: A review. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 247, p. 145–157, 2017.
- DA SILVA, A. P. T. *et al.* Enzymatic catalysis: An environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, n. April, p. 117786, 2020.
- EMBRAPA Soja. Soja em números (safra 2020/21). Brasília, 2020. Disponível em: <https://www.embrapa.br/web/portal/soja/cultivos/soja1/dados-economicos> . Acesso em: 22 nov. 2020.
- EMBRAPA. Exportação agropecuária. Brasília, 2021. Disponível em: <https://www.embrapa.br/macrologistica/exportacao> Acesso em: 13 mar. 2021.
- FERNANDES, K. V. *et al.* Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, 2020.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. *et al.* Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 185–197, 1998.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Editorial for special issue: Enzyme immobilization and its applications. **Molecules**, v. 24, n. 24, p. 6–9, 2019.
- FREY, R.; HAYASHI, T.; BULLER, R. M. Directed evolution of carbon–hydrogen bond activating enzymes. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 60, p. 29–38, 2019.
- GRECO-DUARTE, J. *et al.* Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. **Fuel**, v. 202, p. 196–205, 2017.
- GHOLAMZADEH, P.; MOHAMMADI ZIARANI, G.; BADIEI, A. Immobilization of lipases onto the SBA-15 mesoporous silica. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 35, n. 3, p. 131–150, 2017.
- GIRELLI, A. M.; ASTOLFI, M. L.; SCUTO, F. R. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. **Chemosphere**, v. 244, 2020.
- GROCHULSKI, P. *et al.* Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 17, p. 12843–12847, 1993.
- HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6277–6289, 2013.
- HO, C. K.; MCAULEY, K. B.; PEPPEY, B. A. Biolubricants through renewable

hydrocarbons: A perspective for new opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 113, n. February, p. 109261, 2019.

HUSSEIN, R. Z. K. *et al.* Biomass and bioenergy experimental investigation na process simulation of biolubricant production from waste cooking oil. **Biomass na Bioenergy**, v. 144, n. May 2020, p. 105850, 2021.

IVAN-TAN, C. T. *et al.* Screening of solid base catalysts on palm oil based biolubricant synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 148, p. 441–451, 2017.

JIANG, Y. *et al.* Virus-like organosilica nanoparticles for lipase immobilization : Characterization and biocatalytic applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, n. October 2018, p. 125–134, 2019.

JIN, Q. *et al.* Silica nanowires with tunable hydrophobicity for lipase immobilization and biocatalytic membrane assembly. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 531, p. 555–563, 2018.

KALANTARI, M. *et al.* Tailoring mesoporous-silica nanoparticles for robust immobilization of lipase and biocatalysis. **Nano Research**, v. 10, n. 2, p. 605–617, 2017.

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

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.

LAGE, F. A. P. *et al.* Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 84, p. 56–67, 2016.

LEE, A. *et al.* Preparation of diisononyl adipate in a solvent-free system via an immobilized lipase-catalyzed esterification. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 131, n. April, p. 109340, 2019.

LIU, J. *et al.* Improved catalytic performance of lipase accommodated in the mesoporous silicas with polymer-modified microenvironment. **Langmuir**, v. 28, n. 25, p. 9788–9796, 2012.

LIU, S. *et al.* Investigation of physicochemical and rheological properties of waste cooking oil/SBS/EVA composite modified petroleum asphalt. **Journal of Applied Polymer science**, v.137, n.26, p.1-13,2020.

LÖFGREN, J. *et al.* Transesterification of a Tertiary Alcohol by Engineered *Candida antarctica* Lipase A. **ChemBioChem**, v. 20, n. 11, p. 1438–1443, 2019.

MADHU, A.; CHAKRABORTY, J. N. Developments in application of enzymes for textile processing. **Journal of Cleaner Production**, v. 145, p. 114–133, 2017.

MAGNER, E. Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6213–6222, 2013.

MANOEL, E. A. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015a.

- MANOEL, E. A. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 71, p. 53–57, 2015b.
- MANSIR, N. *et al.* **Modified waste egg shell derived bifunctional catalyst for biodiesel production from high FFA waste cooking oil. A review.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 82, p. 3645-3655, 2018.
- MARTIN, L. S. *et al.* Different organic components on silica hybrid matrices modulate the lipase inhibition by the glycerol formed in continuous transesterification reactions. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 62, p. 462–470, 2018.
- MENDES, A. A. *et al.* Immobilization of a commercial lipase from *Penicillium camembertii* (Lipase G) by different strategies. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.
- MENDES, A. A. *et al.* 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.
- MERCK, 2020. Disponível em: <https://www.merckmillipore.com/BR/pt> . Acesso em 20 de agosto de 2020.
- MOHAMAD, N. R. *et al.* An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.
- MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Immobilization of lipase a from *Candida antarctica* onto Chitosan-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, 2019.
- MORENO-PEREZ, S. *et al.* Enzymatic transesterification in a solvent-free system: synthesis of sn-2 docosahexaenoyl monoacylglycerol. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 3, p. 265–270, 2018.
- NAGHDI, M. *et al.* Removal of pharmaceutical compounds in water and wastewater using fungal oxidoreductase enzymes. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 190–213, 2018.
- NURALIYAH, A.; WIJANARKO, A.; HERMANSYAH, H. Immobilization of *Candida rugosa* lipase by adsorption-crosslinking onto corn husk. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 345, n. 1, 2018.
- OH, J. *et al.* Synthesis of biolubricants using sulfated zirconia catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 455, p. 164–171, 2013.
- PADILHA, G. S.; TAMBOURGI, E. B.; ALEGRE, R. M. Evaluation of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in alginate beads and application in the synthesis of banana flavor (isoamyl acetate). **Chemical Engineering Communications**, v. 205, n. 1, p. 23–33, 2018.
- PAPADAKI, A. *et al.* Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. **Bioresource Technology**, v. 267, p. 311–318, 2018.
- REEVES, C. J.; SIDDAIAH, A.; MENEZES, P. L. A Review on the Science and

Technology of Natural and Synthetic Biolubricants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 3, n. 1, p. 1–27, 2017.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 5, p. 746–770, 2019.

SABOYA, R. M. A. *et al.* WO₃-based catalysts supported on porous clay heterostructures (PCH) with Si-Zr pillars for synthetic esters production. **Applied Clay Science**, v. 124–125, p. 69–78, 2016.

SABOYA, R. M. A. *et al.* Synthesis of biolubricants by the esterification of free fatty acids from castor oil with branched alcohols using cationic exchange resins as catalysts. **Industrial Crops and Products**, v. 104, n. March, p. 52–61, 2017.

SECUNDO, F. *et al.* Adsorption and activities of lipases on synthetic beidellite clays with variable composition. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 109, n. 1–3, p. 350–361, 2008.

SEDDIGI, Z. S. *et al.* Lipases in asymmetric transformations: Recent advances in classical kinetic resolution and lipase–metal combinations for dynamic processes. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 348, p. 54–70, 2017.

SHEMSI, A. M. *et al.* Site-directed chemically-modified magnetic enzymes: fabrication, improvements, biotechnological applications and future prospects. **Biotechnology Advances**, v. 37, n. 3, p. 357–381, 2019.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Overview of fungal lipase: A review. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 166, n. 2, p. 486–520, 2012.

SINGH, A. K.; MUKHOPADHYAY, M. Immobilization of lipase on carboxylic acid-modified silica nanoparticles for olive oil glycerolysis. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, n. 1, p. 115–127, 2018.

SOJI-ADEKUNLE, A. R. *et al.* Modelling of synthesis of waste cooking oil methyl esters by artificial neural network and response surface methodology. **Ambient energy**, v.0750, p 716-725, 2019.

SOUFI, M. D. *et al.* Valorization of waste cooking oil based biodiesel for biolubricant production in a vertical pulsed column: Energy efficient process approach. **Energy**, p. 116266, 2019.

STAVROVA, O.; EHLEBRACHT, D.; FETCHENHAUER, D. Belief in scientific-technological progress and life satisfaction: The role of personal control. **Personality and Individual Differences**, v. 96, p. 227–236, 2016.

SUN, H. *et al.* Biocatalysis for the synthesis of pharmaceuticals and pharmaceutical intermediates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 7, p. 1275–1284, 2018.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: Tuning their stability, activity and specificity. **RSC Advances**, v. 6, n. 102, p. 100281–100294, 2016.

TACIAS-PASCACIO, V. G. *et al.* 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.

ULKER, C.; GOKALP, N.; GUVENILIR, Y. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CALB) on surface-modified rice husk ashes (RHA) via physical adsorption and cross-linking methods. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 34, n. 4, p. 172–180, 2016.

VERDASCO-MARTÍN, C. M. *et al.* Selective synthesis of partial glycerides of conjugated linoleic acids via modulation of the catalytic properties of lipases by immobilization on different supports. **Food Chemistry**, v. 245, p. 39–46, 2018.

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

VIRGEN-ORTÍZ, J. J. *et al.* 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.

YANAGISAWA, T. *et al.* The preparation of alkyltrimethylammonium-kanemite complexes and their conversion to microporous materials. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v.63, p. 988-992, 1990.

ZAINAL, N. A. *et al.* A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, n. June 2016, p. 80–102, 2018.

ZECHNER, R. *et al.* Lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. **Cell Metabolism**, v. 15, n. 3, p. 279–291, 2012.

ZHANG, K. *et al.* Improving the catalytic characteristics of lipase-displaying yeast cells by hydrophobic modification. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 40, n. 11, p. 1689–1699, 2017.

ZHANG, Y.; HE, S.; SIMPSON, B. K. Enzymes in food bioprocessing — novel food enzymes, applications, and related techniques. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 30–35, 2018.

ZHAO, D. *et al.* Nonionic triblock and star diblock copolymer and oligomeric surfactant syntheses of highly ordered, hydrothermally stable, mesoporous silica structures. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 24, p. 6024–6036, 1998.

ZHAO, X. *et al.* Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 182–197, 2015.

ZHENG, M. *et al.* Lipase immobilized in ordered mesoporous silica: A powerful biocatalyst for ultrafast kinetic resolution of racemic secondary alcohols. **Process Biochemistry**, v. 53, p. 102–108, 2017.

ZHONG, L. *et al.* Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207–222, 2020.

3 ARTIGO 1: Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa® Transform 2.0) as heterogeneous biocatalyst

“Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa® Transform 2.0) as heterogeneous biocatalyst” submetido para publicação no periódico indexado FUEL.

Abstract

Trimethylolpropane triesters – TMPTEs (biolubricants) have been produced through enzymatic hydroesterification of refined soybean (RSO) or used soybean cooking (USCO) oils. In the first step, complete hydrolysis of both oils was achieved after 3 h of reaction using a crude free lipase extract from *Candida rugosa* (CRL) to produce free fatty acids (FFAs). Next, CRL, and the lipases from *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase[®] 100L and Eversa[®] Transform 2.0) and *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK) were immobilized via interfacial activation on polystyrene-divinylbenzene (PSty-DVB) beads. High enzyme loaded biocatalysts (immobilization yield above 85%) were obtained for all lipase preparations using an initial protein loading of 40 mg/g. Then, free lipases (liquid or powder forms) or immobilized biocatalysts were employed to produce TMPTEs via enzymatic esterification of the produced FFAs with trimethylolpropane (TMP) in solvent-free systems. Immobilized Eversa[®] Transform 2.0 was the most active biocatalyst in TMPTEs production and maximum OH conversion of $\approx 97\%$ using both FFA sources was achieved after 4 h of reaction conducted in open reactors (to eliminate the formed water) at 55 °C, TMP:FFA ratio of 1:3.25, a stirring rate of 240 rpm, and 15% of mass of biocatalyst per mass of starting materials. Under similar conditions, OH conversion of $\sim 25\%$ after 5 h of reaction was obtained using Novozym[®] 435 as biocatalyst. Immobilized Eversa[®] Transform 2.0 retained above 90% of its original activity after 13 consecutive reaction batches. The produced TMPTEs presented good cold temperature properties (pour point values between -11 and -9 °C).

Keywords: Biolubricants, Hydroesterification, Soybean-based oils, Eversa[®] Transform 2.0, Physicochemical properties.

1. Introduction

Lubricants are compounds used to improve the overall performance and increase the useful life of machines, engines or any metal surfaces by reducing the friction and wear generated between two or more moving surfaces in contact [1,2]. Most of the lubricants commercially available are derived from mineral oils, which have generated serious environmental problems due to their high toxicity and non-biodegradability [1–3]. In this context, biolubricants have been considered to be a promising alternative due to their excellent physicochemical properties such as high viscosity indices, low pour point and high flash point, wearing resistance and non-toxicity [4–8]. They have been produced from several triacylglycerols (TAG) derived from different natural sources, such as vegetable oils, microbial oils, animal fats or used oils [1–3]. For such purpose, the use of monohydric alcohols or polyols to increase the thermal and oxidative stabilities of these biolubricants is preferred to the use of the unmodified oils [2,3]. In this field, polyols such as neopentyl glycol (NPG), trimethylolpropane (TMP), and pentaerythritol (PE) have been widely employed to produce a variety of biolubricants with similar or even better tribological properties when compared to petroleum-based lubricants [2,9–15].

For the industrial application of polyol esters from TMP, minimum triesters concentration in the final product should be of 98%, since the presence of residual FFA and mono- and/or diesters negatively affects their physicochemical properties [16]. The transformation of TAG to produce biolubricants has been performed using homogeneous and heterogeneous catalysts. Currently, there are many proposed approaches for producing several biolubricants from polyols, including TMP, catalyzed by a variety of heterogeneous catalysts such as alginate acid biopolymer [6], silica-sulfuric acid [17], ion-exchange resins [16,17], potassium carbonate [18,19], and immobilized lipases [3,11,12,14,20,21]. The enzymatic route using immobilized lipases is very attractive from an industrial point of view because it offers

some advantages over chemical catalysts such as their high selectivity that promote the low by-products formation, the use of mild conditions (low temperature and pressure) and low energy consumption [3].

The use of immobilized lipases has received a significant attention in industrial processes due to their ease recovery from the reaction mixture and recycling, reduction of water consumption in the purification steps, increase of the environmental compatibility and the fact that they are suitable for developing processes in continuous flow [3,22,23]. Moreover, enzyme immobilization, if properly performed, may improve many enzyme features, such as enzyme activity, stability, selectivity or specificity [24–29]. It may also enlarge the range of conditions where the enzyme may be used [30,31], increase the resistance to chemicals or inhibitors [24,25,27,32], and even may be coupled to enzyme purification [33].

Lipases (triacylglycerol acyl-hydrolases E.C.3.1.1.3) are versatile enzymes that catalyze the hydrolysis of TAG to produce FFA and glycerol [34,35]. They also catalyze the production of valuable esters, including biolubricants, by esterification, transesterification and interesterification reactions in non-aqueous systems [3,26,36,37]. These enzymes have been immobilized using several techniques such as physical adsorption on hydrophobic or ion-exchange supports, covalent attachment, entrapment, cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) and protein-coated micro-crystals (PCMC) [3,22,23,38].

Physical adsorption is a simple and efficient strategy used to immobilize lipases, which involves reversible interactions such as hydrogen bonds, hydrophobic or ionic between enzyme structures and support surfaces [39]. The enzyme desorption from the support surface can occur by modifying incubation temperature, pH, ionic strength or using detergents or detergents-like substrates [26,40,41]. The most common lipase immobilization protocol is the physical adsorption on hydrophobic supports via a peculiar mechanism known as interfacial activation [41]. These enzymes have a polypeptide chain (lid or flap) that covers their active

sites, thus blocking substrate accessibility (closed conformation) in equilibrium with a conformation where the lid is shifted and a large hydrophobic pocket containing their active site is exposed to the reaction system (open form). In the presence of a hydrophobic surface, the lipase is adsorbed to via its open conformation [42,43]. Lipase immobilization via interfacial activation on hydrophobic supports must be typically performed at low ionic strength, and it shifts the closed/open equilibrium towards the enzyme open conformation and reduces the formation of lipase-lipase dimers [41,44,45]. This immobilization protocol has been the most used one to prepare heterogeneous biocatalysts to be utilized in biolubricants production [3].

The objective of the current study was the enzymatic production of TMPTEs from soybean-based oils (RSO and USCO). Soybean is a very abundant source of raw material (e.g., in Brazil, the production of this oil was estimated in 131 million tons in 2020/2021) [46]. It is also much consumed for food frying processes at home, restaurants and industries and this generates a considerable volume of used oils [47]. That way, both refined and used soybean oils are abundant and suitable feedstocks for biolubricants production [4,20], and in the case of the used oil may solve an additional environmental problem by preventing its discarding in Nature.

In this study, TMPTEs were produced via a two-step process called hydroesterification [48], that involves a first hydrolysis of the all acylglycerols contained in the oils to produce FFA, followed by the esterification of the produced FFA with TMP, an alcohol containing three primary hydroxyl groups in its chemical structure (see Fig. 1).

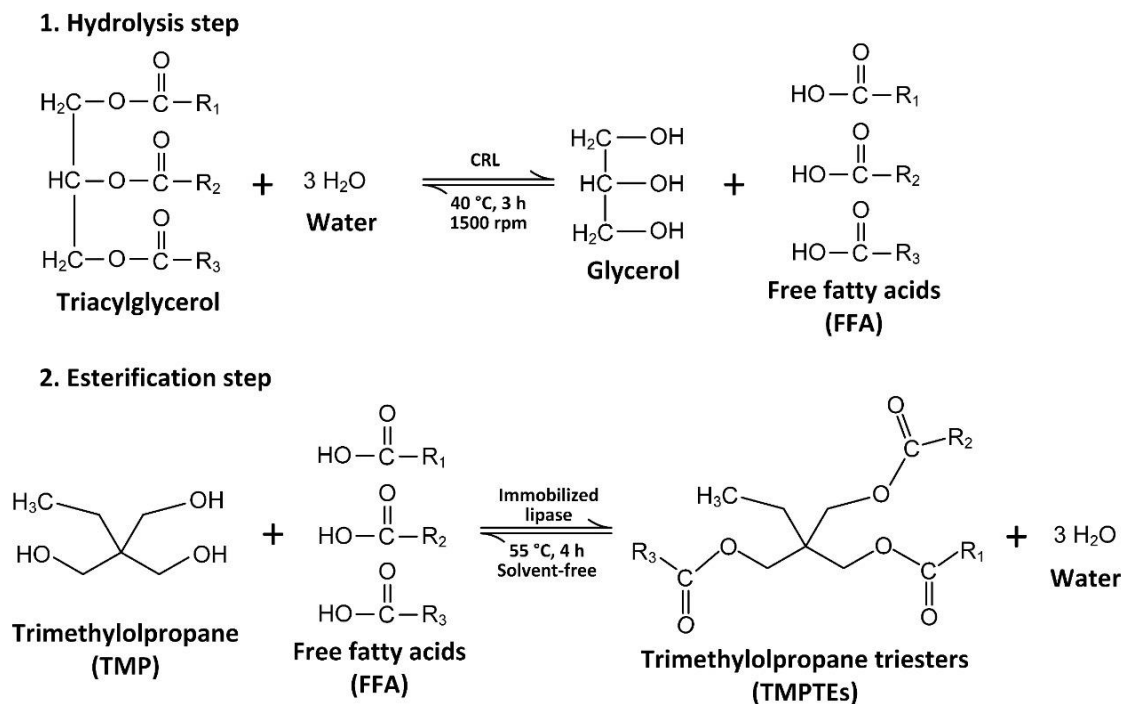


Figure 1. Representative scheme of TMPTEs production via enzymatic hydroesterification of refined and used soybean cooking oils.

We have selected to perform the synthesis in solvent-free systems, as a way to increase the product concentration and reduce wastes. The hydrolysis step requires an enzyme with a wide specificity to hydrolyze all ester bonds of the TAGs in this instance enzyme specificity is an undesired catalyst feature, as we intend a full hydrolysis of the acylglycerols contained in the oils [49–51]. To this goal, the hydrolysis step was performed using CRL as biocatalyst, a very non-specific lipase with high catalytic activity in the hydrolysis of many different TAG [52]. In the second step, the performance of several free lipase extracts, those from TLL – Lipolase[®] 100L [36], Eversa[®] Transform 2.0 – a lipase derived from TLL [53], Amano AK [54], and CRL [52], were utilized to produce TMPTEs esters from FFA derived from both refined and used soybean oils (RSO and USCO). This study compared the free lipase formulations with their immobilized forms prepared via interfacial activation on PSty-DVB beads. It was chosen as support for lipase immobilization, as it has been used for many lipases immobilization [55].

The used support has a high average specific surface area ($\approx 500 \text{ m}^2/\text{g}$) and pore diameter ($\approx 250 \text{ \AA}$), which allows preparing biocatalysts with high protein concentration and catalytic activity [55,56]. The properties of the different biocatalysts (free or immobilized forms) were determined in both aqueous (olive oil emulsion hydrolysis) and non-aqueous (TMPTEs production from RSO) systems. After selecting the most active biocatalyst, it was evaluated the effect of relevant factors on the esterification reaction. Since esterification step is a reversible reaction, adding excess of starting materials and/or removing water molecules generated during the esterification reaction have been required to shift reaction equilibrium towards ester production [11,21,57,58]. The use of very hydrophobic PSty-DVB may prevent the formation of a water phase in the biocatalyst [59,60], that may be very negative for enzyme activity and stability [57,58]. In this sense, the excess of FFA and water removal strategies (operating in closed or open reactors in the absence or presence of molecular sieves) on the reaction were evaluated to increase the reaction rates and conversion regarding the polyol (TMP). In addition, the effect of lipase source (crude extracts or immobilized forms) and biocatalyst concentration were also studied. The performance of the optimal biocatalyst in this reaction prepared in this paper was compared with Novozym[®] 435 – Lipase B from *Candida antarctica* immobilized via interfacial activation on Lewatit VP OC 1600, the most used immobilized lipase in literature [61]. Biocatalyst reusability tests were conducted under the experimental conditions that maximized the esterification reactions.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lipase preparations from *Thermomyces lanuginosus* (Lipolase[®] 100L) and their industrially evolved counterpart (Eversa[®] Transform 2.0) were respectively acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) and Novozymes S.A. (Araucária, PR, Brazil). Lipases

from *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK), and *Candida rugosa* (CRL) were also acquired from Sigma-Aldrich. Their technical information and properties are summarized in Table 1. RSO (Liza, Cargill, SP, Brazil) was purchased at a local market (Alfenas, MG, Brazil). Its fatty acid composition (% m/m) determined as follows: 10.7% palmitic, 3.0% stearic, 24.0% oleic, 56.7% linoleic, 5.4% linolenic and 0.1% arachidic acids [62], with an average molecular mass of 278.6 g/mol. USCO was collected after being used once for French fries preparation from the restaurant at Federal University of Alfenas (Alfenas, MG, Brazil). The samples were collected in 2 L plastic flasks, filtered in a Buchner funnel in order to remove dispersed solids and stored in a freezer at 4 °C before use [63]. TMP [2-ethyl-2-(hydroxymethyl)-1, 3-propanediol] was also acquired from Sigma-Aldrich. Molecular sieve UOP type 3 Å (form rod, and size 1/16 in) was purchased from Fluka Analytical (St. Louis, MO, USA). All other chemical reagents and organic solvents were of analytical grade acquired from Synth[®] Ltd. (São Paulo, SP, Brazil).

Table 1. Technical informations and properties of the crude lipase preparations used in this study.

Properties	Lipases			
Commercial designation	Lipolase [®] 100L	Eversa [®] Transform 2.0	Amano AK	CRL
Source	<i>Thermomyces lanuginosus</i> expressed in <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	<i>Thermomyces lanuginosus</i> expressed in <i>Aspergillus</i> <i>oryzae</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Candida rugosa</i> (Type VII)
Supplier	Novozymes S.A. (Merck)	Novozymes S.A.	Amano Enzyme (Merck)	Merck
Code	L0777	SAE0065	534730	L1754
Lot#	SLBX4002	LRN02013	BCCB6171	MKCB1125V
Formulation	Liquid	Liquid	Powder	Powder
HA ^a (U/g)	27,302.4	19,856.7	8,611.2	16,156.8
Protein ^b (mg/g)	17.0	35.8	20.8	24.5
SA ^c (U/mg _{proteína})	1,606.0	554.6	414.0	659.5
Cost ^d (USD)	306.8 (flask-250 mL)	190.5 (flask-250 mL)	226.8 (flask-50 g)	160.5 (flask-25 g)
Cost (USD/mg _{protein})	0.072	0.021	0.218	0.262

a: Hydrolytic activity determined through olive oil emulsion hydrolysis at pH 8.0 and 37 °C [56].

b: Protein concentration determined according to Bradford's method [66].

c: Specific activity – Ratio between HA and protein concentration [56].

d: 1 US Dollar (USD) = 5.6 Brazil Real (BRL) – Exchange rate at February, 28th, 2021

2.2. Preparation of the heterogeneous lipase biocatalysts via interfacial activation on PSty-DVB

The immobilization of crude lipase extracts via interfacial activation on PSty-DVB beads at low ionic strength was performed according to previous reports [21,56,64]. The enzyme solutions were prepared by mixing crude lipase extracts (liquid or powder forms) with 5 mM buffer sodium acetate at pH 5.0 using a fixed protein loading of 40 mg/g of support [65]. The suspensions (lipase solutions and support) were added to closed glass flasks with 100 mL capacity and shaken at 200 rpm in a controlled water bath temperature at 25 °C using fixed proportions of support and lipase solutions (1:19). After 18 h of contact, the prepared biocatalysts were recovered via filtration in a Buchner funnel under vacuum and thoroughly washed with distilled water to remove unbounded lipase molecules. The prepared immobilized biocatalysts were then stored at 4 °C for 24 h before use. This immobilization strategy ensures that all enzymes were immobilized in monomeric form and in its open form [45].

2.3. Determination of the immobilization parameters

The adsorption process was monitored by measuring the residual hydrolytic activity [65], and protein concentration [66], in the supernatant. Immobilized yield (IY_{HA} – %) was defined as the ratio between the hydrolytic activity immobilized on the support surface at equilibrium (initial activity – residual activity) and initial activity [67]. Immobilized protein concentration at equilibrium (q_e – mg/g of support) was determined according previous reports [56,64]. Immobilized yield based on protein concentration (IY_{q_e} – %) was also determined by the ratio between q_e and initial protein loading (40 mg/g). The catalytic activities of the biocatalysts were assayed using olive oil emulsion as substrate in hydrolysis reactions in a controlled water bath temperature (37 °C and mechanical stirring frequency of 200 rpm) at pH

8.0 – 100 mM buffer sodium phosphate [56,65]. One international unit (1 U) was defined as the mass of biocatalyst required to release 1 μmol of FFA per minute of reaction under the indicated conditions. Specific activity ($\text{SA} = \text{U}/\text{mg}_{\text{protein}}$) was determined using the ratio between hydrolytic activity (U) and protein concentration (mg/mL or mg/g of biocatalyst for free or immobilized biocatalysts, respectively).

2.4. Enzymatic production of TMP esters (TMPTEs) via hydroesterification

In this study, TMPTEs were produced by a two-step enzymatic hydroesterification process using both RSO and USCO [10,13,20].

In the first step, FFA from RSO and USCO were prepared via enzymatic hydrolysis using free CRL as biocatalyst. The reaction system was prepared by mixing RSO or USCO and distilled water at different mass ratio proportions in a plastic flask with a size of 350 mL (reactor height/diameter ratio of 1.5) immersed in a temperature-controlled water bath. In this study, mechanical stirring was provided by using an overhead motor stirrer (Fisatom model 713, motor power 70-130 W and frequency of 50-60 Hz) equipped with a three-blade-helix impeller made of 2 mm thick stainless steel sheet with a diameter of 6 cm. The operating conditions of enzymatic hydrolysis of RSO in a batch system were as follows: reaction temperature of 40 °C, 3.2 g/L of CRL, stirring frequency of 1500 rpm, and oil:water mass ratio of 50% for RSO and 40% for USCO, respectively. Under such operating conditions, full release of the FFA contained in both oils was achieved after 3 h of reaction. The reaction mixtures (100 mL) were transferred to a separation funnel (500 mL), followed by adding 100 mL distilled water at 60 °C and the washing water and FFA phases were separated. The bottom phase (washing water) was disposed of and FFA phase was washed three-times. 20% m/v anhydrous sodium sulfate, which has been previously dried in a muffle furnace at 250 °C by 4 h, was added to the FFA mixtures and kept overnight under static conditions at 25 °C to remove water traces.

In the second step, the direct esterification of the FFA derived from both oils and TMP in solvent-free systems was intended to produce TMPTEs. The reaction mixtures composed of 6 g of starting materials were added in 100 mL glass bottles and immersed in a temperature-controlled water bath at 55 °C by 30 min to dissolve TMP before adding the biocatalysts. Next, the different biocatalysts (free lipase extracts or lipases immobilized on PSty-DVB) were then added and the suspensions were stirred at 240 rpm. Periodically, samples (0.1 g) from the reaction mixtures were collected, diluted in 10 mL of an ethanol/acetone 1:1 (v/v) mixture and titrated with a 40 mM NaOH solution using phenolphthalein as pH indicator for monitoring the reaction progress in terms of OH conversion percentage (Eq. 1) [10,11,14]. Control assays were conducted by adding PSty-DVB beads to the reaction mixtures and no acid consumption was detected.

$$OH\ conversion(\%) = \left(\frac{FFA_0 - FFA_t}{FFA_0} \right) \times \left(\frac{MR}{OH} \right) \times 100 \quad (1)$$

Where: FFA_0 and FFA_t are the initial and residual FFA concentration at a certain time t of reaction (mM), MR is the TMP:FFA molar ratio and OH is the number of hydroxyl groups in TMP structure (3).

Experimental data were represented as mean \pm standard deviation of three replications. The data were analyzed using software OriginPro version 5.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

2.5. Effect of parameters on the esterification reaction of FFA from RSO

2.5.1. Effect of the lipase source

The effect of lipase source using free or immobilized lipase formulations on PSty-DVB was firstly evaluated to select the most active biocatalyst in TMPTEs production. Esterification reactions were performed in 100 mL closed glass reactors immersed at 55 °C by 24 h using

TMP:FFA molar ratio of 1:3 (0.83 g TMP – 6.2 mmol; 5.17 g FFA – 18.55 mmol), 240 rpm, and protein concentration of 2.5 mg/g of reaction mixture.

2.5.2. Effect of TMP:FFA molar ratio

In sequence, it was studied the effect of TMP:FFA molar ratio on the reaction catalyzed by Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB particles at a proportion of 10% m/m (that corresponds to 3.36 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture). The reactions were conducted in 100 mL closed glass reactors at 55 °C under fixed stirring frequency (240 rpm) at 24 h. In this set of experiments, TMP:FFA molar ratio of 1:3 (0.83 g TMP – 6.2 mmol; 5.17 g FFA – 18.55 mmol); 1:3.25 (0.77 g TMP – 5.74 mmol; 5.23 g FFA – 18.77 mmol); and 1:3.5 (0.73 g TMP – 5.4 mmol; 5.27 g FFA – 18.9 mmol) were tested.

2.5.3. Effect of biocatalyst concentration

The effect of immobilized Eversa[®] Transform 2.0 concentration varying from 5% m/m (or 1.68 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture) to 20% m/m (or 6.72 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture) on the ester production was also studied for reactions performed in closed glass reactors by 24 h at 55 °C, 240 rpm and TMP:FFA molar ratio of 1:3.25 (0.77 g TMP – 5.74 mmol; 5.23 g FFA – 18.77 mmol).

2.5.4. Effect of water removal strategies

In this set of experiments, esterification reactions were conducted at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25 (0.77 g TMP – 5.74 mmol; 5.23 g FFA – 18.77 mmol), 15% m/m of immobilized Eversa[®] Transform 2.0 (that corresponds to 5.04 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture), contact time of 24 h using closed or open glass reactors in the absence or presence of molecular sieves at a fixed concentration of 5% m/m.

2.6. Enzymatic production of TMP esters (TMPTEs) by esterification using FFA from RSO and USCO as feedstocks

TMPTEs production was performed at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25 (0.77 g TMP – 5.74 mmol; 5.23 g FFA – 18.77 mmol), contact time of 4 h using open glass reactors in the absence of molecular sieves and biocatalyst concentration of 15% m/m of reaction mixture. In this set of experiments, immobilized Eversa[®] Transform 2.0 (5.04 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture) and Novozym[®] 435 were tested as biocatalysts.

2.7. Biocatalyst operational stability tests

These tests were performed under optimal conditions using FFA from both oils (RSO and USCO) in open glass reactors in the absence of molecular sieves. At the end of each reaction batch, the biocatalyst was recovered from the reaction mixture via filtration in a Buchner funnel under vacuum, washed with cold hexane to remove any reactant molecules retained in the support and maintained overnight in a freezer at 4 °C under static conditions. Then, the used biocatalyst was re-suspended in a fresh substrate batch to start new reaction cycle. OH conversion percentage was calculated at the end of each batch, as shown in Eq. (1).

2.8. Product alkaline polishing procedure

The esterification reaction mixtures were transferred to 100 mL screw-capped glass bottles (100 mL) and 4% m/m NaOH solution (1.15 mol excess to FFA) was added in order to promote the saponification of any residual FFA, according to the methodology described by Nielsen *et al.* [68], with slight modifications. The systems were immersed at 60 °C under continuous mechanical stirring frequency (240 rpm) for 30 min. The resulting solution was

transferred to a separation funnel (500 mL), followed by adding 200 mL distilled water at 60 °C. The bottom phase (washing water) was eliminated and the upper phase, composed of TMPTEs was three-times washed following this protocol. 20% m/v anhydrous sodium sulfate, dried in a muffle furnace at 250 °C for 24 h, was also added to the esters and kept overnight under static conditions at 25 °C to remove water traces.

2.9. NMR analysis

¹H (300 MHz) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra were recorded on a Bruker AC 300 equipment (Bruker BioSpin, Germany) using deuterated chloroform as solvent and tetramethylsilane as internal standard.

2.10. TMPTEs characterization

Physicochemical properties of TMPTEs from RSO and USCO were analyzed according to American Society for Testing and Materials (ASTM) standard methods. Kinematic viscosities at 40 °C was determined with a LVDV-II cone and plate spindle Brookfield viscometer (Brookfield Viscosimeters Ltd., Harlow, UK) using a CP 42 cone, based on the ASTM D445 method. Density at 20 °C was determined using a DMA 35N EX digital densimeter (Anton Paar, Ashland, VA, USA). Acid value was measured using ASTM D974 method. Pour point was determined according to ASTM D97 method. The assays were performed with three replications and the experimental results represent the average values.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of lipases immobilized via interfacial activation on PSty-DVB

In this study, heterogeneous biocatalysts were prepared via interfacial activation of lipases on PSty-DVB particles [55,56] to be used in the esterification of FFA with TMP in

solvent-free systems. For such purpose, it was used a fixed protein loading of 40 mg protein per gram of support [65]. Commercial lipase preparations from TLL such as Lipolase[®] 100L [36], and Eversa[®] Transform 2.0 [53], Amano AK [54], and CRL [52], were chosen as model enzymes due to their high catalytic activities in esters production, including biolubricants, using several starting materials [10,20,21,50,65,69,70]. A representative scheme of enzymatic hydroesterification of refined and used soybean cooking oils to produce TMPTEs is illustrated in Fig. 1.

Lipase solutions under same experimental conditions in the absence of support were prepared as control assays and all lipases retained all of their initial activities during the immobilization processes [67]. This means that all lipase disappeared from the supernatant is due to their immobilization on the support surface. The immobilization parameters of the heterogeneous biocatalysts prepared are reported in Table 2. These lipase molecules have different tridimensional structures and their extracts may have stabilizing agents in their formulations that could influence the adsorption process and the final properties of the lipase immobilized via interfacial activation [71–73]. However, high immobilized yield in terms of immobilized activity (above 85%) and protein loadings (between 33.2 ± 0.4 and 36.6 ± 0.4 mg/g of support) were achieved due to the high affinity of the lipase by the support surface, high support surface and large pore size of the support able to adsorb high protein amounts [55,56]. Similar immobilization yields based on both the activity and protein for all lipases can also be observed, although always a slightly higher immobilization yield is observed using activity. This may be due to the fact that, even although the lipases are always the main fraction of the used enzymes, the immobilization via interfacial activation on hydrophobic supports at low ionic strength may purify these enzymes [41,65]. On the other hand, the biocatalysts prepared exhibited different catalytic activities on the olive oil emulsion hydrolysis. The highest activity has been observed when using Lipolase[®] 100L (255.9 ± 3.9 U/g), followed by Eversa[®]

Transform 2.0 (158.0 ± 1.9 U/g), Amano AK (119.0 ± 0.5 U/g) and CRL (81.2 ± 5.0 U/g). Specific activity values obtained for all the biocatalysts prepared show a drastic decrease of hydrolytic activity when compared with crude lipase extracts (see Table 1) due to possible diffusional effects – substrate and pH gradients [74,75]. However, the objective of this study was the use of the biocatalysts in esters production (reactions in organic media), therefore decisions were not taken with these results obtained in olive oil hydrolysis.

Table 2. Properties of the biocatalysts prepared via interfacial activation of lipases on PSty-DVB beads.

Properties	Lipases			
	Lipolase [®] 100L	Eversa [®] Transform 2.0	Amano AK	CRL
IA ^a (U/mL)	1320.6 ± 74.7	605.4 ± 37.2	814.1 ± 14.7	1622.3 ± 102.4
RA ^b (U/mL)	58.9 ± 3.1	54.5 ± 3.1	124.2 ± 7.3	62.5 ± 2.1
IY _{HA} ^c (%)	95.3	90.9	84.8	94.0
q _e ^d (mg/g)	36.6 ± 0.4	35.3 ± 0.5	33.2 ± 0.4	35.2 ± 0.8
IY _{protein} ^e (%)	91.5	88.3	83.0	88.0
HA ^f (U/g)	255.9 ± 3.9	158.0 ± 1.9	119.0 ± 0.5	81.2 ± 5.0
SA ^g (U/mg _{protein})	7.0	4.5	3.6	2.3

a: Initial hydrolytic activity in the supernatant.

b: Residual hydrolytic activity in the supernatant at equilibrium.

c: Immobilization yield based on the hydrolytic activity immobilized on the support surface.

d: Immobilized protein concentration at equilibrium.

e: Immobilization yield based on the protein immobilized on the support surface.

f: Hydrolytic activity.

g: Specific activity.

3.2. Performance of crude extracts and immobilized lipases on TMPTEs production

The performance of free lipase extracts and immobilized biocatalysts was also evaluated in the production of TMPTEs by esterification of FFA from RSO with TMP in solvent-free systems. As shown in Fig. 2, different catalytic properties were also observed in the esterification reactions. Similar esterification activities for free lipases and immobilized formulations were found when using Lipolase[®] 100L (Fig. 2A), CRL (Fig. 2C) and Amano AK (Fig. 2D), although in all cases a more slightly faster reaction was detected using the immobilized enzymes. Free and immobilized CRL yielded a FFA conversion between 74 (free – powder lipase) and 81.5% (immobilized) after 24 h of reaction while the maximum OH conversion was lower than 20% when using both forms of Lipolase[®] 100L and Amano AK. However, Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB gave the highest conversion among all assayed biocatalysts (ca. 83%) after 24 h of reaction (Fig. 2B). Its initial catalytic activity was about 10-fold higher than that of its liquid extract, and the reaction was much curved, giving only 8% of conversion in this time span. The strong changes in the performance of this enzyme in esterification reaction had been previously reported using as immobilization technology the production of CLEAs [69]. That way, even if the enzyme was designed to be used as a liquid formulation [53], this is another clear example where the use of an appropriate immobilization technique may greatly improve the performance of this enzyme [76]. From these results, immobilized Eversa[®] Transform 2.0 was selected to continue the studies on the production of biolubricant via esterification.

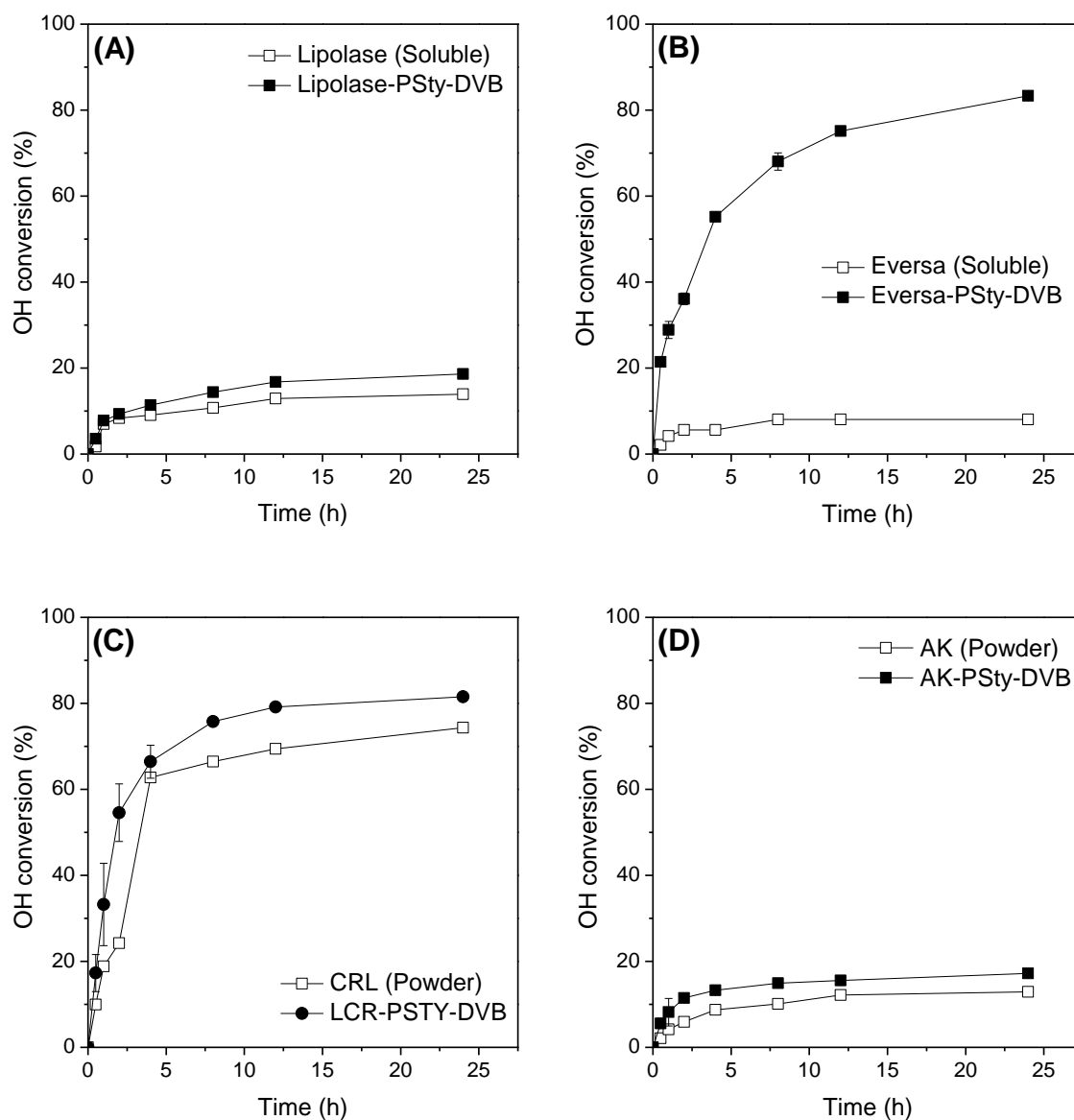


Figure 2. Effect of lipase source (crude extracts or immobilized on PSty-DVB) on the TMPTEs production. Esterification reactions at 55 °C by 24 h using TMP:FFA molar ratio of 1:3, 240 rpm, and protein concentration of 2.5 mg/g of reaction mixture.

3.3. Effect of TMP:FFA molar ratio on TMPTEs production

In this set of experiments, the effect on the esterification reaction of TMP:FFA molar ratio was investigated by varying it from 1:3 to 1:3.5 (that means to vary from a OH/COOH stoichiometric molar ratio to an excess of 0.16 eq.). Since esterification is a thermodynamically controlled reaction [77], FFA excess in the reaction system can increase the yield regarding the

alcohol [11,20]. A linear and similar profile for the esterification reactions could be observed during the first 5 h (Fig. 3). After this period, OH conversion increased when a slight excess of FFA in the reaction mixture was used (TMP:FFA molar ratio of 1:3.25). Maximum OH conversion was increased from 83.5% after 24 h of reaction under stoichiometric molar ratio to 90.5% after 12 h of reaction at TMP:FFA molar ratio of 1:3.25. Similar OH conversion was observed at the highest TMP:FFA molar ratio assayed (1:3.5). From these results, a molar ratio of 1:3.25 was chosen for the next tests.

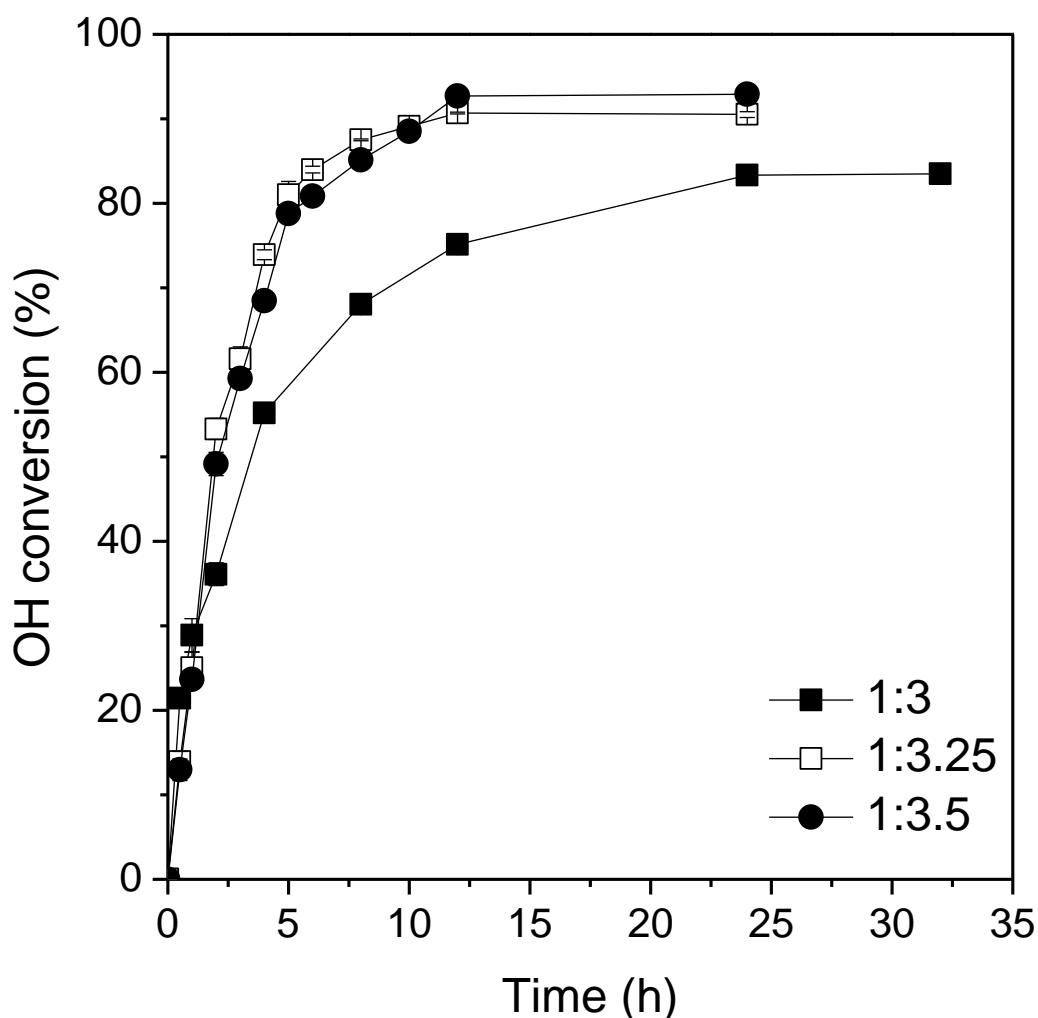


Figure 3. Effect of TMP:FFA molar ratio on TMPTEs production catalyzed by Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB at a proportion of 10% m/m (3.36 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture). The reactions were conducted in closed glass reactors at 55 °C, 240 rpm and 24 h.

3.4. Effect of biocatalyst concentration on TMPTEs production

The biocatalyst concentration in the reaction will affect the duration of the reaction cycle, at first glance, the higher amount of biocatalysts, the higher reaction rate will be obtained. However, in certain cases the amount of immobilized biocatalyst may also affect the reaction performance. For example, the proper mixing of the solid biocatalyst in the reactor may be not appropriate if using an excess of biocatalyst. Moreover, the water activity may be affected by altering the biocatalyst/volume of reaction ratio, as the support can capture water from the system [78,79]. In this study, the effect of biocatalyst concentration in the reactor on the esterification reaction was investigated varying the value from 5% m/m to 20% m/m that corresponds to 1.68 and 6.72 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture, respectively (discounting the mass of support). As shown in Fig. 4, there was a rise in the initial reaction rate and OH conversion by increasing the biocatalyst concentration from 5% to 15% m/m. As it can be observed, maximum OH conversion of 96% after 12 h of reaction was achieved using 15% m/m. Similar OH conversion values were obtained at the highest biocatalyst concentration (20% m/m). From these results, a biocatalyst concentration of 15% m/m was used for evaluating the effects of the other parameters on the esterification reaction.

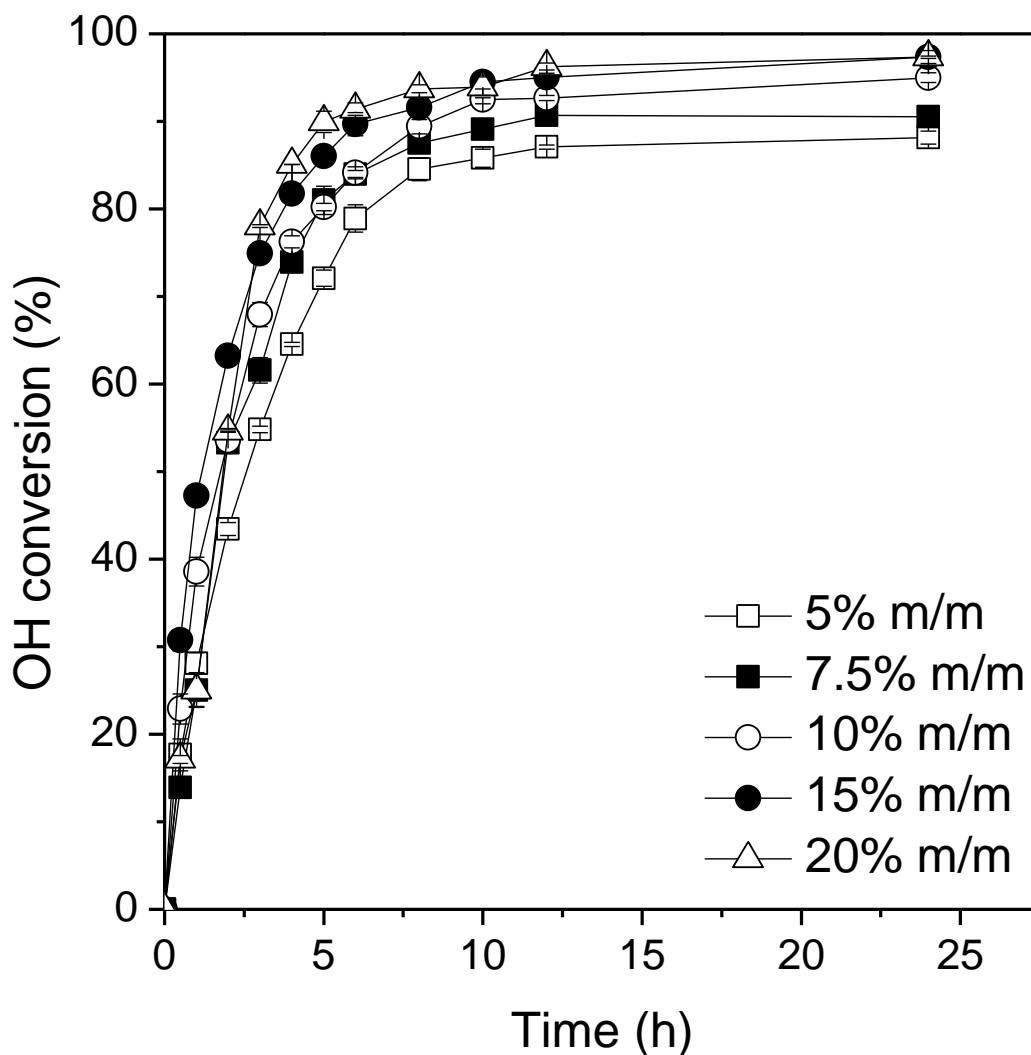


Figure 4. Effect of immobilized Eversa[®] Transform 2.0 concentration on TMPTEs production. Esterification reactions conducted in closed glass reactors by 24 h at 55 °C, 240 rpm and TMP:FFA molar ratio of 1:3.25.

3.5. Effect of water removal strategies on TMPTEs production

The catalytic performance of lipases in esterification reactions depends on the water concentration in the reaction system [57,58]. In this field, there are different strategies for water molecules removal generated during the reaction in order to shift the chemical equilibrium towards ester production. The most used strategies for this purpose are pervaporation, evaporation by vacuum, water capture by molecular sieves, and reactors operating in open

conditions [20,78,80,81]. In this study, molecular sieves and/or esterification reactions conducted in open systems were used for removing the water molecules produced in the reaction and compared with a reaction system performed in the absence of any water removal strategies. According to Fig. 5, TMPTEs production in a closed reactor and absence of molecular sieves gave a maximum OH conversion of 93% after 12 h of reaction. On the other hand, esterification conducted in an open reactor or using molecular sieves at 5% m/m required only 4 h of reaction to achieve OH conversion of $\approx 97\%$. These results clearly show that the water elimination from the reaction mixture via evaporation at atmospheric pressure (at this temperature) was effective for improving the ester production. Therefore, esterification reaction performed in open reactor was selected for conducting subsequent studies.

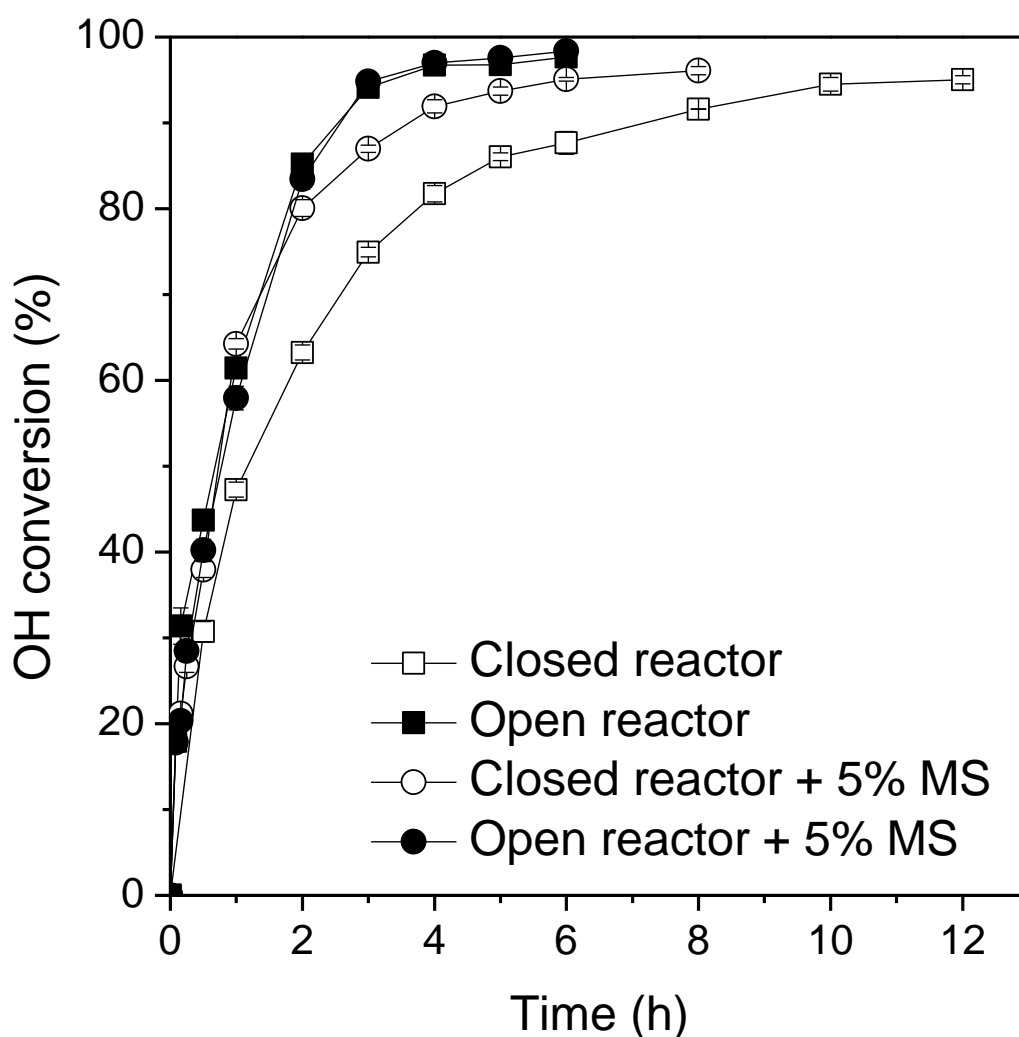


Figure 5. Effect of water removal strategies on TMPTEs production. Esterification reactions were performed at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, 15% m/m of immobilized Eversa[®] Transform 2.0 on PSty-DVB, 24 h of reaction using closed or open glass reactors in the absence or presence of molecular sieves (MS) at a fixed concentration of 5% m/m of reaction mixture.

3.6. TMPTEs production by esterification using FFA from RSO and USCO as feedstocks

The experimental conditions that maximize the enzymatic production of TMPTEs using FFA from RSO were also applied to catalyze esterification reaction of FFA from USCO. The tests were conducted in open reactors at 55 °C, with a stirring rate of 240 rpm, and a TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, utilizing 15% m/m of immobilized Eversa[®] Transform 2.0. Its catalytic performance was compared with those of Novozym[®] 435, a commercial immobilized lipase widely used in biotransformation reactions [61], including the production of synthetic esters with lubricant properties [4,10,82]. The progress of the reactions is illustrated in Fig. 6. Similar esterification profiles for both FFA sources were observed using these two heterogeneous biocatalysts, suggesting that the used oil (under the conditions utilized in this paper) presented very similar properties to the refined oil. According to results, the new heterogeneous Eversa[®] Transform 2.0 biocatalyst exhibited better catalytic performance than that of Novozym 435 and maximum OH conversion around of $\approx 97\%$ for both FFA sources was observed after only 4 h of reaction. On the other hand, maximum OH conversion for Novozym[®] 435 was only of 25% at 5 h of reaction. The moderate catalytic performance of this biocatalyst to produce biolubricants using polyols (TMP or NPG) and FFA from soybean oil as starting materials has also been observed in a recent study [10], which is in agreement with the results obtained in this study.

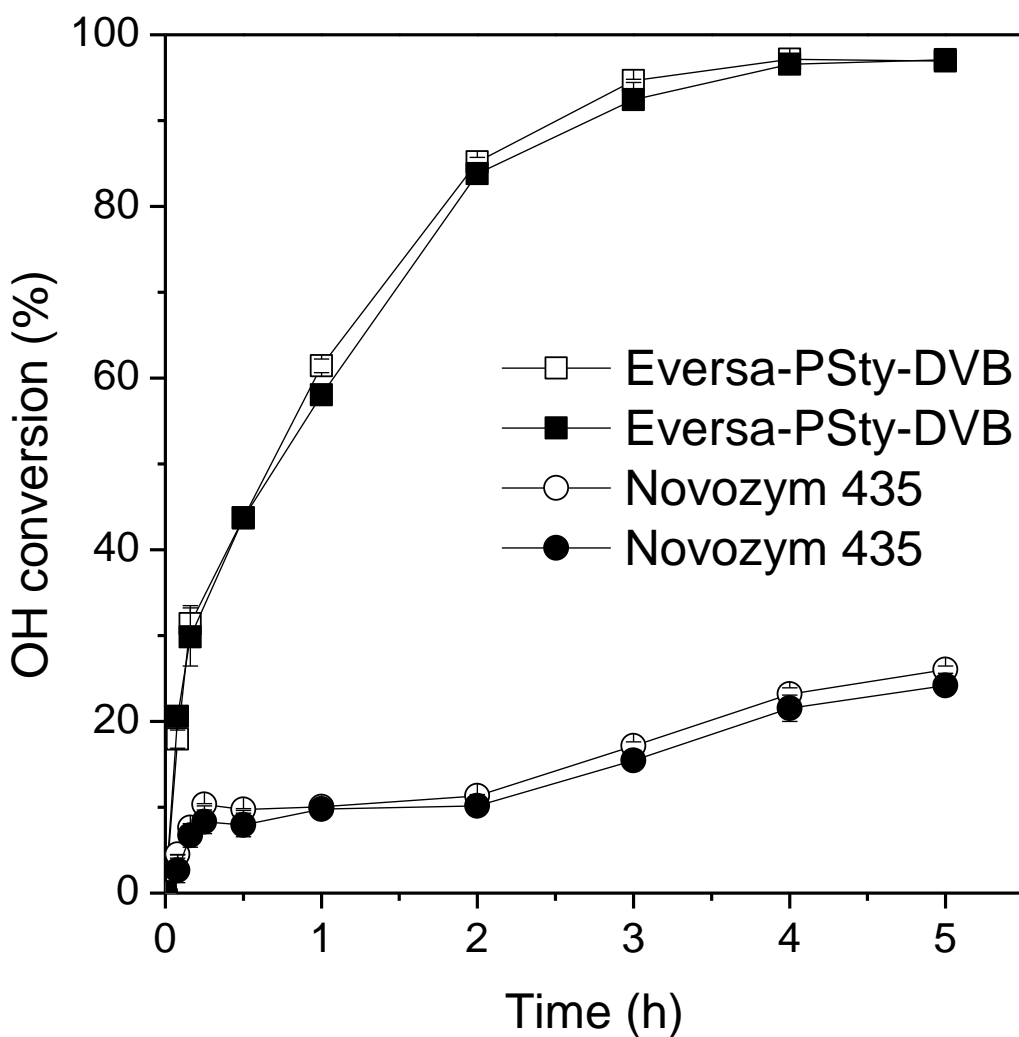


Figure 6. TMPTEs production catalyzed by Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB and [®] 435 using FFA from RSO (open symbols) and USCO (closed symbols). The reactions were performed at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, 15% m/m of biocatalyst per gram of reaction mixture in open glass reactors in the absence of molecular sieves.

3.7. Structural characterization and physicochemical properties of TMPTEs produced from RSO and USCO

According to ¹H NMR spectra of the produced TMPTEs from RSO (Fig. 7A) and USCO (Fig. 7B), it is possible to observe a singlet at 4.00 ppm that is characteristic of hydrogen attached to carbon next to oxygen of the ester group (-COOCH₂-), and a triplet at 2.25 ppm of

hydrogen linked to carbon next to the carboxyl group ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOCH}_2-$), that confirm the esters production. Signals at 5.33 ppm is characteristics for hydrogen linked to sp^2 carbon (olefinic) and at 2.76 ppm of methylene group ($-\text{CH}_2-$) between two double bonds confirm the presence of mono- and polyunsaturated fatty acids such as oleic, linoleic and linolenic acids in their chemical structures. These spectra proved also preferential TMPTEs production (an intense signal at 4.00 ppm), which corroborates with the results obtained for the titrimetric method (OH conversion of $\approx 97\%$). Similar ^1H NMR spectra for TMPTEs production from different vegetable oils have also been observed in previous reports [19,20].

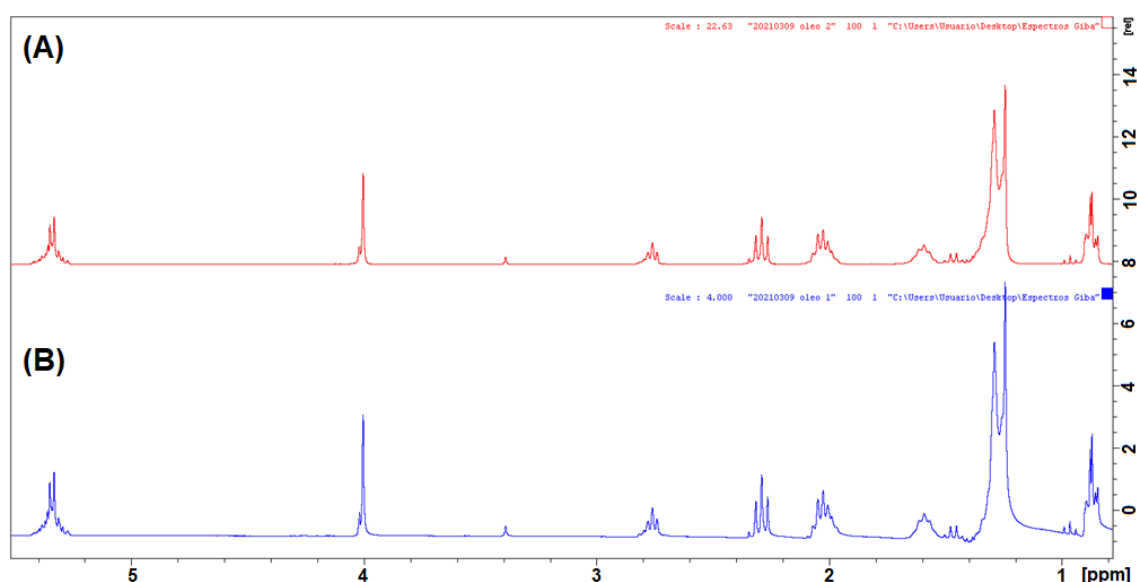


Figure 7. ^1H NMR spectra of TMPTEs produced from RSO (A) and USCO (B).

Physicochemical properties of the esters produced were determined and compared with TMP esters from soybean oils reported in the literature and those ones commercially available from several companies – Zschimmer & Schwarz and Emery Oleochemicals (Table 3). Density at 20 °C was similar to TMP-oleate esters supplied by Emery Oleochemicals (Dehylub 4030). Acid values for both produced TMPTEs were slightly higher compared with commercial TMP-oleate (Dehylub 4030) and TMP esters from soybean oil [83]. The produced TMPTEs show satisfactory low temperature performance as indicated by pour point values (between -11 and

–9 °C), which are in accordance with a previous report [83]. On the other hand, the produced TMPTEs exhibited better low temperature performance than the commercial TMP ester – Lexolube 3JN-310 (pour point of 0 °C). The esters produced exhibited higher viscosity than TMP esters from refined soybean oils described in literature [10,83], and commercially available from several companies such as Lexolube 3JN-310 [84], Lexolube FG-20 HX1 [85], and Dehylub 4030 [86]. However, these values summarized in Table 3 were similar to TMP esters produced via enzymatic esterification using soybean fatty acids distillate (SFAD) as feedstock – 38.64 mm²/s at 40 °C [11], and they are in the range from 6 to 255 cSt for different polyol esters reported in literature [2]. Further studies, including oxidation and thermal stabilities, viscosity at 100 °C for determining viscosity index value and tribological evaluation still are required. However, the experimental data described in Table 3 indicate their potential application as industrial lubricants because some of their physicochemical properties are within the wide range of properties for different polyol esters described in literature [2].

Table 3. Physicochemical properties of TMPTEs and comparison with commercial and produced TMPTEs in previous reports.

Properties	Units	TMPTEs from RSO ^a	TMPTEs from USCO ^a	TMPTEs from RSO ^b	TMPTEs from RSO ^c	Commercial TMPTEs ^d	Commercial TMPTEs ^e	Commercial TMP-oleate ^f	Polyol esters ^g
Density at 20°C	Dimensionless	0.909	0.915	NR ^h	NR ^h	NR ^h	NR ^h	0.914–0.920	NR ^h
Pour point	°C	–11	–9	–12	NR ^h	0	–40	<–40	–64 to 5
Acid value	mgKOH/g	1.8	1.5	0.11	NR ^h	NR ^h	NR ^h	0 – 1	NR ^h
Viscosity at 40 °C	mm ² /s (cSt)	34.4	36.6	27.57	25.2	30	20	42 – 50	6–255
Viscosity at 100 °C	mm ² /s (cSt)	NR ^h	NR ^h	6.75	6.7	5.8	4.4	NR ^h	2–18
Viscosity Index	Dimensionless	NR ^h	NR ^h	219	242	150	140	NR ^h	46–229

a: This study

b: Dodos *et al.* [83]c: Cavalcanti *et al.* [10]

d: Lexolube 3JN-310 [84]

e: Lexolube FG-20 HX1 [85]

f: Dehylub 4030 [86]

g: Ho *et al.* [2]

h: Not reported.

3.8. Biocatalyst operational stability tests

One of the advantages of using heterogeneous biocatalysts in industrial processes is that they can be easily recovered from the reaction system and reused in subsequent reactions, if the enzyme activity is maintained [22,23,38]. The operational stability of Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB beads in successive batch reactions of 4 h each in solvent-free systems was investigated under identical operating conditions (see Section 2.7 in “Materials and methods”). As shown in Fig. 8, the biocatalyst prepared retained ~95% of its initial activity after 13 batch reactions using FFA from RSO as feedstock (OH conversion of 92% at 13th batch). For FFA from USCO, a slight decrease of its activity after the 5th batch of reaction was observed and OH conversion of ~86% was obtained at 13th batch (88% of the original activity). The difference may be due to some difference in the oxidation and polymerization degrees of the substrate [87], perhaps also some occlusion of the pores of the biocatalysts may be produced by some polymerized FFA. These results show an excellent reusability of the prepared biocatalyst. Moreover, a correct elimination of residual starting materials and/or products retained on the biocatalyst microenvironment during the washing and drying steps can also reduce possible inactivation of the enzyme [21,88].

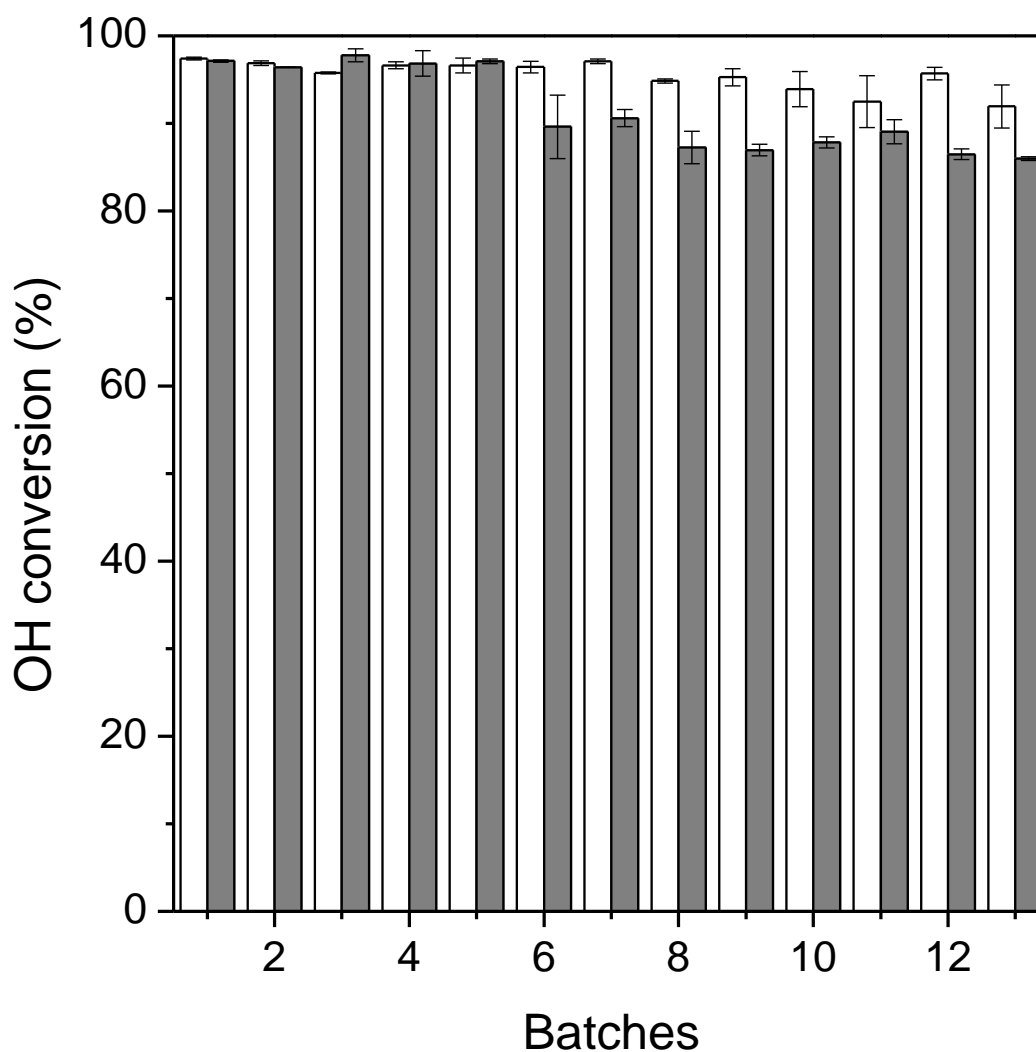


Figure 8. Biocatalyst operational stability tests for TMPTEs production using FFA from RSO (white bars) and USCO (gray bars) catalyzed by Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB. The reactions were performed in open glass reactors in the absence of molecular sieves at 55 °C, 240 rpm, TMP:FFA molar ratio of 1:3.25, and 15% m/m of biocatalyst per gram of reaction mixture.

3.9. Comparing with previous reports

A comparative study with previous reports described in literature for the enzymatic production of TMP esters was performed, as summarized in Table 4. In general, high OH conversion of $\approx 97\%$ from several oleaginous feedstocks can be observed using heterogeneous

biocatalysts as lyophilized crude enzymatic extract [11], or lipases immobilized via physical adsorption [10,11,78]. However, the biocatalyst prepared in this study required a much shorter reaction time to achieve this maximum conversion (only 4 h of reaction). Moreover, it retained high catalytic activity after several reaction cycles. This comparative analysis shows clearly that Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB can be an interesting alternative for TMP esters production due to its low-cost, highest catalytic activity and effective stability after successive batches. These results are even more interesting when the free enzyme was the one with the poorest reaction performance.

Table 4. Literature survey for enzymatic production TMP esters.

Lipase source	Support	Immobilization protocol	Oleaginous feedstock (Reaction type)	Yield/Conversion (%)	Reaction time (h)	Reuse (residual activity - %)	Reference
Lipase B from <i>Candida antarctica</i> (Novozym [®] 435)	Lewatit VP OC 1600	Physical adsorption	Rapeseed oil (Transesterification)	98 (Yield)	200	NP	[82]
<i>Candida</i> sp. 99–125	Hydrophobic silk fibers	Physical adsorption	Caprylic acid (Esterification)	97.3 (Acid conversion)	47	NP	[89]
<i>Candida rugosa</i> (Lipomod 34MDP)	Polypropylene (Accurel MP1000)	Physical adsorption	FFA from RSO (Hydroesterification)	100% (OH conversion)	24	6 (100)	[10]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipozyme TL 100L)	Duolite A568	Physical adsorption	High oleic fatty acid from palm oil (Esterification)	95	9	NP	[78]
<i>Candida rugosa</i> (Lipomod 34MDP)	-	-	Soybean fatty acid distillate (Esterification)	94 (OH conversion)	24	8 (100)	[11]
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Eversa [®] Transform 2.0)	PSty-DVB	Physical adsorption	FFA from RSO (Hydroesterification) FFA from USCO (Hydroesterification)	≈97 (OH conversion)	4	13 (95%) 13 (88%)	This study

4. Conclusion

TMPTEs from refined (RSO) and used soybean cooking (USCO) oils were produced via enzymatic hydroesterification using a green process (solvent-free systems). In this study, lipase from *Candida rugosa* was chosen to produce FFA via hydrolysis. Free crude extracts and home-made immobilized lipases from four commercial lipase preparations were analyzed to catalyze TMPTEs production by esterification. Eversa[®] Transform 2.0, a low-cost lipase preparation derived from *T. lanuginosus*, was the one with the worst performance, but when it was immobilized on PSty-DVB, it exhibited the highest catalytic activity in the esterification reaction. Under selected operating conditions, OH conversion of $\approx 97\%$ using both soybean-based oils was achieved under mild reaction conditions after only 4 h of reaction. Besides, the biocatalyst can be easily separated via filtration and reused for 13 reaction cycles without significant losses in its catalytic activity. The physicochemical properties of the produced esters were similar those of the synthetic esters described in literature or commercially available from several companies. This study demonstrated that the use of waste oils does not require any initial processing step for biolubricant production and its use as feedstock for these processes is a sustainable and economical option because there is a large volume available. Moreover, Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB can also be an interesting option as heterogeneous biocatalyst to catalyze synthetic esters production in industrial processes due to its high catalytic activity and reusability. This lipase was designed by industry to be utilized in the biodiesel production as a liquid formulation, but the results in this paper show that the potential of this enzyme may be greatly improved when immobilized following suitable strategy. Its catalytic performance should also be tested using other different edible and non-edible oils.

Authors' contributions

Wagner C. A. Carvalho performed the experimental work, original draft preparation and final editing of the manuscript. Jaine H. H. Luiz performed the NMR analysis. Adriano A. Mendes, Jaine H. H. Luiz, Daniela B. Hirata, and Roberto Fernandez-Lafuente and took care of the conceptualization, supervision, funding acquisition, and paper writing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. The authors also thank the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Process APQ–02196–15), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Process 404929/2016–8) and Ministerio de Ciencia y Innovación-Spanish Government (project number CTQ2017-86170-R). Wagner C. A. Carvalho thanks CAPES for the student fellowship. Adriano A. Mendes thanks Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Brazil) for the research fellowship (Process 310633/2020-6). The authors gratefully acknowledge the Profa. Ana K. F. de Carvalho (Federal University of Alfenas, MG, Brazil) by the viscosity analyses and Novozymes S.A. (Araucária, PR, Brazil) by the donation of the lipase preparation Eversa® Transform 2.0.

References

- [1] Zainal NA, Zulkifli NWM, Gulzar M, Masjuki HH. A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. *Renew Sustain Energy*

- Rev 2018;82:80–102. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.004>.
- [2] Ho CK, McAuley KB, Peppley BA. Biolubricants through renewable hydrocarbons: A perspective for new opportunities. *Renew Sustain Energy Rev* 2019;113:109261. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109261>.
- [3] Bolina ICA, Gomes RAB, Mendes AA. Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: Current Scenario and Future Perspectives. *Bioenergy Res* 2021:1–19. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10242-4>.
- [4] Angulo B, Fraile M, Gil L, Herrerías CI, SI SG, El Zafranar PI. Comparison of Chemical and Enzymatic Methods for the Transesterification of Waste Fish Oil Fatty Ethyl Esters with Different Alcohols 2020. <https://doi.org/10.1021/acsomega.9b03147>.
- [5] Moreira DR, Chaves POB, Ferreira EN, Arruda TBMG, Rodrigues FEA, Neto JFC, *et al* . Moringa polyesters as eco-friendly lubricants and its blends with naphthalenic lubricant. *Ind Crops Prod* 2020;158:112937. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112937>.
- [6] Cheryl-Low YL, Kong PS, Lee HV. Environmentally adapted bio-oil compounds-derived polyolesters synthesis: Optimization and properties of base fluids. *J Hazard Mater* 2021;407:124365. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124365>.
- [7] Elmelawy MS, El-Meligy A, Mawgoud HA, Morshedy AS, Hanafy SA, El-sayed IE tantawy. Synthesis and kinetics study of trimethylolpropane fatty acid triester from oleic acid methyl ester as potential biolubricant. *Biomass Convers Biorefinery* 2021:1–13. <https://doi.org/10.1007/s13399-020-01220-z>.
- [8] Hu S, Zhu J, Wu B, Ma R, Li X. Green synthesis of ester base oil with high viscosity — Part II: Reaction kinetics study. *Chem Eng Res Des* 2021;165:51–60. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.10.015>.
- [9] Sripada PK, Sharma R V., Dalai AK. Comparative study of tribological properties of

- trimethylolpropane-based biolubricants derived from methyl oleate and canola biodiesel. *Ind Crops Prod* 2013;50:95–103. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.018>.
- [10] Cavalcanti EDC, Aguiéiras ÉCG, da Silva PR, Duarte JG, Cipolatti EP, Fernandez-Lafuente R, *et al* . Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. *Fuel* 2018;215:705–13. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.119>.
- [11] Fernandes K V., Cavalcanti EDC, Cipolatti EP, Aguiéiras ECG, Pinto MCC, Tavares FA, *et al* . Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. *Catal Today* 2021;362:122–9. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.060>.
- [12] Fernandes KV, Papadaki A, da Silva JAC, Fernandez-Lafuente R, Koutinas AA, Freire DMG. Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. *Ind Crops Prod* 2018;116:90–6. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.058>.
- [13] Papadaki A, Fernandes KV, Chatzifragkou A, Aguiéiras ECG, da Silva JAC, Fernandez-Lafuente R, *et al* . Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. *Bioresour Technol* 2018;267:311–8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.07.016>.
- [14] Aguiéiras ÉCG, Cavalcanti EDC, da Silva PR, Soares VF, Fernandez-Lafuente R, Bessa Assunção CL, *et al* . Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials. *Renew Energy* 2020;148:689–96. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.10.156>.
- [15] Gul M, Zulkifli NWM, Kalam MA, Masjuki HH, Mujtaba MA, Yousuf S, *et al* . RSM and Artificial Neural Networking based production optimization of sustainable Cotton bio-lubricant and evaluation of its lubricity & tribological properties. *Energy Reports*

- 2021;7:830–9. <https://doi.org/10.1016/j.egy.2021.01.033>.
- [16] Kuzminska M, Backov R, Gaigneaux EM. Complementarity of heterogeneous and homogeneous catalysis for oleic acid esterification with trimethylolpropane over ion-exchange resins. *Catal Commun* 2015;59:222–5. <https://doi.org/10.1016/j.catcom.2014.10.033>.
- [17] Kerman CO, Gaber Y, Ghani NA, Lämsä M, Hatti-Kaul R. Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. *J Mol Catal B Enzym* 2011;72:263–9. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.014>.
- [18] Mehdi S, Asghari A, Ghobadian B, Dehghani Soufi M. Conversion of *Pistacia atlantica* mutica oil to trimethylolpropane fatty acid triester as a sustainable lubricant. *Biomass Convers Biorefinery* 2020;10:139–48. <https://doi.org/10.1007/s13399-019-00452-y>.
- [19] Nie J, Shen J, Shim YY, Tse TJ, Reaney MJT. Synthesis of Trimethylolpropane Esters by Base-Catalyzed Transesterification. *Eur J Lipid Sci Technol* 2020;122:1900207. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201900207>.
- [20] Sarno M, Iuliano M, Cirillo C. Optimized procedure for the preparation of an enzymatic nanocatalyst to produce a bio-lubricant from waste cooking oil. *Chem Eng J* 2019;377:120273. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.210>.
- [21] Lage FAP, Bassi JJ, Corradini MCC, Todero LM, Luiz JHH, Mendes AA. Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme Microb Technol* 2016;84:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.007>.
- [22] Quayson E, Amoah J, Hama S, Kondo A, Ogino C. Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renew Sustain Energy Rev* 2020;134:110355. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2020.110355>.

- [23] Zhong L, Feng Y, Wang G, Wang Z, Bilal M, Lv H, *et al* . Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. *Int J Biol Macromol* 2020;152:207–22. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>.
- [24] Mateo C, Palomo JM, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb Technol* 2007;40:1451–63. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.01.018>.
- [25] Garcia-Galan C, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R, Rodrigues RC. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Adv Synth Catal* 2011;353:2885–904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>.
- [26] Adlercreutz P. Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev* 2013;42:6406–36. <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>.
- [27] Rodrigues RC, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Fernández-Lafuente R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chem Soc Rev* 2013;42:6290–307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>.
- [28] Ismail AR, Baek KH. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. *Int J Biol Macromol* 2020;163:1624–39. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.09.021>.
- [29] Aggarwal S, Chakravarty A, Ikram S. A comprehensive review on incredible renewable carriers as promising platforms for enzyme immobilization & thereof strategies. *Int J Biol Macromol* 2021;167:962–86. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.11.052>.
- [30] Dal Magro L, Kornecki JF, Klein MP, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Optimized immobilization of polygalacturonase from *Aspergillus niger* following different protocols: Improved stability and activity under drastic conditions. *Int J Biol Macromol*

- 2019;138:234–43. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.07.092>.
- [31] Dal Magro L, Kornecki JF, Klein MP, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Pectin lyase immobilization using the glutaraldehyde chemistry increases the enzyme operation range. *Enzyme Microb Technol* 2020;132:109397. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109397>.
- [32] Rodrigues RC, Berenguer-Murcia Á, Fernandez-Lafuente R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. *Adv Synth Catal* 2011;353:2216–38. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100163>.
- [33] Barbosa O, Ortiz C, Berenguer-Murcia Á, Torres R, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. *Biotechnol Adv* 2015;33:435–56. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.
- [34] Schmid RD, Verger R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew Chemie Int Ed* 1998;37:1608–33. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980703\)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V).
- [35] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2002;13:390–7. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00341-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00341-5).
- [36] Fernandez-Lafuente R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym* 2010;62:197–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>.
- [37] Facin BR, S. Melchior M, Valério A, Vladimir Oliveira J, de Oliveira D. Driving Immobilized Lipases as Biocatalysts: 10 Years State of the Art and Future Prospects. *Ind Eng Chem Res* 2019;58:5358–78. <https://doi.org/10.1021/acs.iecr.9b00448>.
- [38] Monteiro RRC, dos Santos JCS, Alcántara AR, Fernandez-Lafuente R. Enzyme-Coated Micro-Crystals: An Almost Forgotten but Very Simple and Elegant Immobilization

- Strategy. *Catalysts* 2020;10:891. <https://doi.org/10.3390/catal10080891>.
- [39] Jesionowski T, Zdarta J, Krajewska B. Enzyme immobilization by adsorption: a review n.d. <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.
- [40] Virgen-Ortíz JJ, Tacias-Pascacio VG, Hirata DB, 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 Microb Technol* 2017;96:30–5. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.010>.
- [41] Rodrigues RC, Virgen-Ortíz JJ, dos Santos JCS, Berenguer-Murcia Á, Alcantara AR, Barbosa O, *et al* . Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol Adv* 2019;37:746–70. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.
- [42] Derewenda U, Swenson L, Green R, Wei Y, Yamaguchi S, Joerger R, *et al* . Current progress, in crystallographic studies of new lipases from filamentous fungi. *Protein Eng Des Sel* 1994;7:551–7. <https://doi.org/10.1093/protein/7.4.551>.
- [43] Verger R. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 1997;15:32–8. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0).
- [44] Palomo JM, Fuentes M, Fernández-Lorente G, Mateo C, Guisan JM, Fernández-Lafuente R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 2003;4:1–6. <https://doi.org/10.1021/bm025729+>.
- [45] Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, Rueda N, Fernandez-Lafuente R. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol* 2015;71:53–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.02.001>.
- [46] • Lubricants market volume worldwide by selected country 2019 | Statista n.d.

- <https://www.statista.com/statistics/821076/lubricants-global-market-volume-by-country/> (accessed March 19, 2021).
- [47] César A da S, Werderits DE, de Oliveira Saraiva GL, Guabiroba RC da S. The potential of waste cooking oil as supply for the Brazilian biodiesel chain. *Renew Sustain Energy Rev* 2017;72:246–53. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.11.240>.
- [48] Pourzolfaghar H, Abnisa F, Daud WMAW, Aroua MK. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. *Renew Sustain Energy Rev* 2016;61:245–57. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2016.03.048>.
- [49] Barbosa MS, Freire CCC, Almeida LC, Freitas LS, Souza RL, Pereira EB, *et al* . Optimization of the enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* Lam oil using molecular docking analysis for fatty acid specificity. *Biotechnol Appl Biochem* 2019;66:823–32. <https://doi.org/10.1002/bab.1793>.
- [50] Costa MJ, Silva MRL, Ferreira EEA, Carvalho AKF, Basso RC, Pereira EB, *et al* . Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. *Chem Eng Process - Process Intensif* 2020;157:108131. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108131>.
- [51] Bressani APP, Garcia KCA, Hirata DB, Mendes AA. Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: Optimization by response surface methodology. *Bioprocess Biosyst Eng* 2015;38. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1267-5>.
- [52] Domínguez De María P, Sánchez-Montero JM, Sinisterra J V., Alcántara AR. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol Adv* 2006;24:180–96. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>.
- [53] Monteiro RRC, Arana-Peña S, da Rocha TN, Miranda LP, Berenguer-Murcia Á, Tardioli PW, *et al* . Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is

- it really an optimal solution? *Renew Energy* 2021;164:1566–87.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.10.071>.
- [54] Rios NS, Pinheiro BB, Pinheiro MP, Bezerra RM, dos Santos JCS, Barros Gonçalves LR. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: Sources, properties and applications. *Process Biochem* 2018;75:99–120.
<https://doi.org/10.1016/j.procbio.2018.09.003>.
- [55] C. Rodrigues R, Hernandez K, Barbosa O, Rueda N, Garcia-Galan C, C. S. dos Santos J, *et al* . Immobilization of Proteins in Poly-Styrene-Divinylbenzene Matrices: Functional Properties and Applications. *Curr Org Chem* 2015;19:1707–18.
<https://doi.org/10.2174/1385272819666150429231728>.
- [56] Alves MD, Aracri FM, Cren ÉC, Mendes AA. Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem Eng J* 2017;311. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069>.
- [57] Colombié S, Tweddell RJ, Condoret J-S, Marty A. Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. *Biotechnol Bioeng* 1998;60:362–8. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<362::AID-BIT13>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<362::AID-BIT13>3.0.CO;2-O).
- [58] Sandoval G, Condoret JS, Monsan P, Marty A. Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: Kinetic and thermodynamic arguments. *Biotechnol Bioeng* 2002;78:313–20. <https://doi.org/10.1002/bit.10224>.
- [59] Marty A, Dossat V, Condoret J-S. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. *Biotechnol Bioeng* 1997;56:232–7. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971020\)56:2<232::AID-BIT12>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971020)56:2<232::AID-BIT12>3.0.CO;2-I).
- [60] Séverac E, Galy O, Turon F, Pantel CA, Condoret JS, Monsan P, *et al* . Selection of CalB

- immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. *Enzyme Microb Technol* 2011;48:61–70. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.09.008>.
- [61] Ortiz C, Ferreira ML, Barbosa O, Dos Santos JCS, Rodrigues RC, Berenguer-Murcia Á, *et al* . Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *Catal Sci Technol* 2019;9:2380–420. <https://doi.org/10.1039/c9cy00415g>.
- [62] Santos KC, Cassimiro DMJ, Avelar MHM, Hirata DB, de Castro HF, Fernández-Lafuente R, *et al* . Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. *Ind Crops Prod* 2013;49. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.05.035>.
- [63] Phan AN, Phan TM. Biodiesel production from waste cooking oils. *Fuel* 2008;87:3490–6. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2008.07.008>.
- [64] Machado NB, Miguez JP, Bolina ICA, Salviano AB, Gomes RAB, Tavano OL, *et al* . Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. *Enzyme Microb Technol* 2019;128:9–21. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.001>.
- [65] Bassi JJ, Todero LM, Lage FAP, Khedy GI, Ducas JD, Custódio AP, *et al* . Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. *Int J Biol Macromol* 2016;92. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.097>.
- [66] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [67] Boudrant J, Woodley JM, Fernandez-Lafuente R. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochem* 2020;90:66–80.

- <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>.
- [68] Nielsen PM, Rancke-Madsen A, Holm HC, Burton R. Production of Biodiesel Using Liquid Lipase Formulations. *J Am Oil Chem Soc* 2016;93:905–10. <https://doi.org/10.1007/s11746-016-2843-4>.
- [69] Guimarães JR, Miranda LP, Fernandez-Lafuente R, Tardioli PW. Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology Converts It in a Suitable Biocatalyst for Biolubricant Production Using Waste Cooking Oil. *Molecules* 2021;26:193. <https://doi.org/10.3390/molecules26010193>.
- [70] Bolina ICA, Salviano AB, Tardioli PW, Cren ÉC, Mendes AA. Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. *Int J Biol Macromol* 2018;120. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.08.190>.
- [71] Arana-Peña S, Rios NS, Carballares D, Mendez-Sanchez C, Lokha Y, Gonçalves LRB, *et al* . Effects of Enzyme Loading and Immobilization Conditions on the Catalytic Features of Lipase From *Pseudomonas fluorescens* Immobilized on Octyl-Agarose Beads. *Front Bioeng Biotechnol* 2020;8:36. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00036>.
- [72] Arana-Peña S, Rios NS, Carballares D, Gonçalves LRB, Fernandez-Lafuente R. Immobilization of lipases via interfacial activation on hydrophobic supports: Production of biocatalysts libraries by altering the immobilization conditions. *Catal Today* 2021;362:130–40. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.059>.
- [73] Lokha Y, Arana-Peña S, Rios NS, Mendez-Sanchez C, Gonçalves LRB, Lopez-Gallego F, *et al* . Modulating the properties of the lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on octyl agarose beads by altering the immobilization conditions. *Enzyme Microb Technol* 2020;133:109461. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.109461>.
- [74] Regan DL, Lilly MD, Dunnill P. Influence of intraparticle diffusional limitation on the

- observed kinetics of immobilized enzymes and on catalyst design. *Biotechnol Bioeng* 1974;16:1081–93. <https://doi.org/10.1002/bit.260160808>.
- [75] Shen L, Chen Z. Critical review of the impact of tortuosity on diffusion. *Chem Eng Sci* 2007;62:3748–55. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.03.041>.
- [76] Martínez-Sánchez JA, Arana-Peña S, Carballares D, Yates M, Otero C, Fernández-Lafuente R. Immobilized Biocatalysts of Eversa ® Transform 2.0 and Lipase from *Thermomyces Lanuginosus*: Comparison of Some Properties and Performance in Biodiesel Production n.d. <https://doi.org/10.3390/catal10070738>.
- [77] Kasche V. Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products. *Enzyme Microb Technol* 1986;8:4–16. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90003-7).
- [78] Kim H, Choi N, Kim Y, Kim HR, Lee J, Kim IH. Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. *Renew Energy* 2019;130:489–94. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.092>.
- [79] Páez BC, Medina AR, Rubio FC, Moreno PG, Grima EM. Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 2003;33:845–53. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00219-9).
- [80] Cui C, Zhen Y, Qu J, Chen B, Tan T. Synthesis of biosafe isosorbide dicaprylate ester plasticizer by lipase in a solvent-free system and its sub-chronic toxicity in mice. *RSC Adv* 2016;6:11959–66. <https://doi.org/10.1039/c5ra27537g>.
- [81] Dörmo N, Bélafi-Bakó K, Bartha L, Ehrenstein U, Gubicza L. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. *Biochem Eng J* 2004;21:229–34. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2004.06.011>.
- [82] Gryglewicz S, Muszyński M, Nowicki J. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based

- lubricants. *Ind Crops Prod* 2013;45:25–9. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.11.038>.
- [83] Dodos GS, Anastopoulos G, Zannikos F. Tribological evaluation of biobased lubricant basestocks from cottonseed and soybean oils. *SAE Tech. Pap.*, vol. 3, SAE International; 2010, p. 378–85. <https://doi.org/10.4271/2010-01-1545>.
- [84] Lexolube 3JN-310 - zslubes n.d. <https://zslubes.com/product/lexolube-3jn-310/> (accessed March 21, 2021).
- [85] Lexolube FG-20 HX1 - zslubes n.d. <https://zslubes.com/product/lexolube-fg-20-hx1/> (accessed March 21, 2021).
- [86] (No Title) n.d. https://www.emeryoleo.com/sites/default/files/2019-11/Emery_BL_brochure.pdf (accessed March 21, 2021).
- [87] Hwang HS, Ball JC, Doll KM, Anderson JE, Vermillion K. Investigation of polymers and alcohols produced in oxidized soybean oil at frying temperatures. *Food Chem* 2020;317:126379. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126379>.
- [88] Lima LCD, Peres DGC, Mendes AA. Kinetic and thermodynamic studies on the enzymatic synthesis of wax ester catalyzed by lipase immobilized on glutaraldehyde-activated rice husk particles. *Bioprocess Biosyst Eng* 2018;41. <https://doi.org/10.1007/s00449-018-1929-9>.
- [89] Tao Y, Cui C, Shen H, Liu L, Chen B, Tan T. Enhancing trimethylolpropane esters synthesis through lipase immobilized on surface hydrophobic modified support and appropriate substrate feeding methods. *Enzyme Microb Technol* 2014;58–59:60–7. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2014.02.006>.

4 CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO

O presente trabalho proposto nesta dissertação de mestrado mostrou uma alternativa interessante na utilização de biocatalisadores heterogêneos, o que abre um leque de oportunidades para a aplicação de Eversa Transform 2.0 imobilizada em PSDVB para obtenção de produtos de interesse industrial, como o caso dos biolubrificantes. Esta importante classe de produtos do setor oleoquímico vem impulsionando pesquisas em todo o mundo para uma possível transição dos lubrificantes convencionais para os biolubrificantes, uma opção vantajosa não apenas para o meio ambiente, mas também no que se refere à viabilidade econômica devido ao seu menor custo comparado com outras lipases disponíveis comercialmente. Além disso, este estudo sugere que óleos residuais oriundos do processamento de alimentos podem ser empregados como matérias-primas, o que também é atrativo para o setor devido ao seu menor custo em relação aos óleos refinados e também minimiza seus problemas ao meio ambiente devido aos descartes inapropriados.

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produção de biolubrificantes empregando Eversa® Transform 2.0 imobilizada a partir de outros óleos vegetais comumente encontrados em nosso país tais como óleo de macaúba, milho, óleos residuais da indústria de pescado e borra de refino de óleos vegetais, óleos microbianos e de algas;
- Produção contínua de biolubrificantes em outras configurações de reatores (leito fixo e fluidizado);
- Avaliação econômica do processo de síntese de biolubrificantes;
- Produção de biolubrificantes empregando outros álcoois como Neopentilglicol, etilenoglicol, sorbitol e óleo fúsel;
- Aplicação do biocatalisador preparado em outras reações de interesse industrial;