

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MARCUS VINICIUS SILVEIRA CAMBRAIA

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL
DE UM ÉSTER (LEVULINATO DE ISOAMILA) CATALISADA POR EVERSA
TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADA VIA ATIVAÇÃO INTERFACIAL**

Alfenas/MG

2022

MARCUS VINICIUS SILVEIRA CAMBRAIA

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL
DE UM ÉSTER (LEVULINATO DE ISOAMILA) CATALISADA POR Eversa
TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADA VIA ATIVAÇÃO INTERFACIAL

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Coorientadora: Profa. Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho

Alfenas/MG

2022

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Silveira Cambraia, Marcus Vinicius.

Desenvolvimento de um processo para a produção sustentável de um éster (levulinato de isoamila) catalisada por eversa transform 2.0 imobilizada via ativação interfacial / Marcus Vinicius Silveira Cambraia. - Alfenas, MG, 2022.

86 f. : il. -

Orientador(a): Adriano Aguiar Mendes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2022.

Bibliografia.

1. Éster de ácido levulínico. 2. Biorrefinaria. 3. Imobilização de lipase. 4. Eversa® Transform 2.0. 5. Esterificação. I. Aguiar Mendes, Adriano, orient. II. Título.

DESENVOLVIMENTO DE UM PROCESSO PARA A PRODUÇÃO SUSTENTÁVEL DE UM ÉSTER (LEVULINATO DE ISOAMILA) CATALISADA POR EVERSA TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADA VIA ATIVAÇÃO INTERFACIAL

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. Área de concentração: Biotecnologia.

Aprovado em: 08 de julho de 2022

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

Prof. Dr. Milson Dos Santos Barbosa
Instituição: Universidade Tiradentes

Profa. Dra. Joelise de Alencar Figueira Angelotti
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Aguiar Mendes, Presidente**, em 08/07/2022, às 16:47, 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 **Joelise de Alencar Figueira Angelotti, Professor do Magistério Superior**, em 08/07/2022, às 16:47, 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 **Milson dos Santos Barbosa, Usuário Externo**, em 08/07/2022, às 16:48, 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, informando o código verificador **0767764** e o código CRC **4EF12B40**.

AGRADECIMENTOS

Sou grato a cada momento que passei executando esse mestrado acadêmico, acredito que aprendi muitas lições tanto pessoais como acadêmicas, que colocarei em prática pelo resto de minha vida.

Quero agradecer aos meus pais Adriana Silveira e Helio Ananias Francisco pelo apoio, confiança e incentivo, sempre torcendo e vibrando a cada nova conquista. O meu namorado Matheus, que esteve comigo a todo momento que eu passei de felicidades e dificuldades, me auxiliando e motivando. Aos nossos amigos, Nicole e Gustavo pelos momentos divididos e pelo apoio fundamental, em todos os momentos. Aos colegas de pesquisa e laboratório por sempre estarem presentes e dispostos a ajudar.

Ao orientador, Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, por me aceitar como aluno de mestrado, pela paciência em me orientar nesse projeto, por cada detalhe e tempo dedicado. Muito obrigado professor pelos ensinamentos que serão usados durante toda a minha vida. Acredito que trabalhamos em parceria para que tudo tenha dado certo. À co-orientadora, Ana Karina, pelo apoio na execução desse projeto.

À Universidade Federal de Alfenas, por conceder a esta oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou a realização desse projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ–01691–21) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 404929/2016–8 e 310633/2020-6) pelo suporte financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Financiamento 001.

RESUMO

Os ésteres de ácido levulínico (AL) são de grande importância devido às suas diferentes aplicações como agentes aromatizantes, lubrificantes, fragrâncias e plastificantes. O presente estudo consistiu na produção enzimática de éster de ácido levulínico por esterificação enzimática empregando álcool isoamílico (AI). As reações foram catalisadas por uma lipase comercial de baixo custo (Eversa[®] Transform 2.0) imobilizada em esferas mesoporosas de poliestireno-divinilbenzeno (PSty-DVB) via ativação interfacial (adsorção por interações hidrofóbicas). A imobilização foi realizada em baixa força iônica (tampão 5 mmol.L⁻¹ de acetato de sódio pH 5,0) a 25°C empregando um carregamento inicial de proteína de 40 mg.g⁻¹ de suporte. O processo de imobilização foi acompanhado pela concentração de proteína e atividade hidrolítica desaparecidas no sobrenadante. Inicialmente, foi testada a sua atividade catalítica na produção do éster em meios de solvente orgânico e comparada com a reação realizada em meio isento de solventes. Em seguida, foi proposto um planejamento composto central rotacional (DCCR) com duas variáveis independentes (concentração do biocatalisador e temperatura de reação) para avaliar a influência na produção do éster em termos de porcentagem de conversão e produtividade que foram tomadas como variáveis dependentes (respostas). Foi também avaliada a influência da razão molar AL:AI e tempo de reação acordo. Nas condições ótimas de reação, foram realizados testes de reuso do biocatalisador preparado após sucessivas bateladas de reação. De acordo com os resultados obtidos, a máxima concentração de proteína imobilizada de 31,2 ± 2,8 mg g⁻¹ e um rendimento imobilização de ≈83% foi obtido. Esse resultado satisfatório se deve à alta área superficial e diâmetro de poros do suporte testado. A produção de levulinato de isoamila foi favorecida com a adição de solventes orgânicos no meio de reação. Dentre os solventes testados, a máxima produção do éster foi obtida usando metil-isobutil-cetona (MIBC). Nas condições ótimas de reação, a conversão máxima da ordem de 65%, foi obtida após 12 h de reação a 40°C empregando concentração de biocatalisador de 20% m.m⁻¹ e razão molar AL:AI de 1:1,5 em meio de MIBC. A estratégia proposta nesse estudo mostrou ser bastante promissora, pois trata-se de um processo sustentável e utiliza uma lipase de baixo custo imobilizada como biocatalisador.

Palavras-chave: Éster de ácido levulínico; Biorrefinaria; Imobilização de lipase; Eversa[®] Transform 2.0; Esterificação.

ABSTRACT

Levulinic acid esters are organic compounds of great importance due to their variety of applications such as flavoring components, lubricants, flavors and polymer plasticizers. Moreover, they can also be applied in the blending of biofuel components. The present study consisted of the enzymatic production of levulinic acid ester through enzymatic esterification of levulinic acid (LA) and isoamyl alcohol (IA). In this study, the reactions were catalyzed by a low-cost commercial lipase (Eversa® Transform 2. Transform 2.2.) immobilized via mechanism of interfacial activation (hydrophobic interactions) on mesoporous polystyrene-divinbenzene (PSty-DVB) particles. The immobilization process was performed at low ionic strength (5 mmol.L⁻¹ buffer sodium acetate pH 5.0) at 25 °C using an initial loading of 40 mg protein g⁻¹ support. The adsorption was monitored by determining protein concentration and hydrolytic activity in the supernatant solution at equilibrium. The influence of several organic solvents on the ester production was initially investigated and then compared with a solvent-free system. After selecting the most suitable organic solvent, a central composite rotatable design (CCRD) was performed to examine the influence of biocatalyst concentration and temperature on the acid conversion percentage and productivity. Maximum protein loading of 31.2 ± 2.8 mg.g⁻¹ of support and immobilization yield of $\approx 83\%$ was reached. These results are due to high average surface area and large pore size of the support that allows immobilize a large amount of protein on both external and internal surfaces. The use of polar organic solvents was a crucial approach for producing isoamyl levulinate using the prepared heterogeneous biocatalyst. According to results, esterification reactions performed in a methyl isobutyl ketone (MIBK) medium gave the highest acid conversion percentage. Maximum acid conversion percentage of $\approx 65\%$ was achieved after 12 h of reaction at 40 °C using a biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ and LA:IA molar ratio of 1:1.5 in a MIBK medium. The proposed experimental procedure can be a promising strategy to sustainably produce a valuable industrial ester (isoamyl levulinate) from biomass-based materials using a low-cost commercial immobilized lipase as potential biocatalyst.

Keywords: Levulinic acid ester; Biorefinery; Lipase immobilization; Eversa® Transform 2.0; Esterification.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 – Visão geral das quatro gerações de biorrefinaria, considerando suas matérias-primas, produtos e imperfeições.....	17
Figura 2 – Alguns derivados químicos obtidos do ácido levulínico.....	20
Figura 3 – Lipase imobilizada via ativação interfacial em suporte hidrofóbico.....	31

CAPÍTULO 1

Figure 1 – Representative scheme of enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification.....	51
Figure 2 – Influence of organic solvents on the enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification conducted using a stoichiometric LA:IA molar ratio (500 mmol.L ⁻¹ of each reactant), biocatalyst concentration of 10% m.m ⁻¹ of reaction mixture, mechanical stirring of 240 rpm and 40 °C.....	53
Figure 3 – 3D surface plots/contour plots for the enzymatic production of isoamyl levulinate. Effect of reaction temperature and biocatalyst concentration on the acid conversion percentage (A) and productivity (B).....	60
Figure 4 – Influence of LA:IA molar ratio on the enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification. The reactions were performed at fixed LA concentration (500 mmol.L ⁻¹ in a MIBK medium), biocatalyst concentration of 20% m.m ⁻¹ of reaction mixture, mechanical stirring of 240 rpm, 40 °C and reaction time of 3 h.....	65
Figure 5 – Effect of reaction time on the enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification. The reactions were performed at fixed LA concentration (500 mmol.L ⁻¹ in a MIBK medium), mechanical stirring of 240 rpm, 40 °C and protein amount of 39.6 mg that corresponds to 1.2 g of heterogeneous biocatalyst (20% m.m ⁻¹)....	66

Figure 6 – Reusability tests for successive esterification batches performed using a LA:IA molar ratio of 1:1.5 at fixed LA concentration (500 mmol.L^{-1} in a MIBK medium), biocatalyst concentration of $20\% \text{ m.m}^{-1}$ of reaction mixture, mechanical stirring of 240 rpm and 40°C . Relative activity of 100% corresponds to an acid conversion percentage of $\approx 65\%$ 71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Exemplos de sínteses de compostos a partir de ácido levulínico derivado de biomassa usando sistemas catalisados por lipases.....	24
---	----

CAPÍTULO 1

Table 1 – CCRD matrix for the analysis of the effect of independents variables on the enzymatic production of isoamyl levulinate in terms of acid conversion and productivity. The reactions were performed under fixed mechanical stirring (240 rpm), stoichiometric LA:IA molar ratio (500 mmol.L ⁻¹ of each reactant in a MIBK medium) and contact time (3 h).....	55
Table 2 – Regression coefficients, standard errors and p-values for the proposed models (acid conversion percentage and productivity) of enzymatic ester production.....	56
Table 3 – Analysis of variance (ANOVA) for the proposed models (acid conversion percentage and productivity) of enzymatic ester production.....	58
Table 4 – Ester production under optimal conditions determined by analysis of 3D surface plots/contour plots.....	63
Table 5 – Literature survey for LAAEs production using several heterogeneous catalysts in batch reactors.....	68

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	BIORREFINARIA.....	15
2.2	ÉSTERES DE ÁCIDO LEVULÍNICO	19
2.3	LIPASES	27
2.4	PRINCIPAIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	29
3	ARTIGO 1: PROCESS OPTIMIZATION FOR ENZYMATIC PRODUCTION OF A VALUABLE BIOMASS-BASED ESTER FROM LEVULINIC ACID.....	40
4	CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO.....	84
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	85

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da história, com o desenvolvimento humano e o tecnológico, principalmente nos últimos dez anos, o uso dos recursos naturais foi a base da economia, resultando em mais benefícios, como mais tipos de produtos disponíveis para consumo (COPA REY *et al.*, 2021; DE VARGAS MORES *et al.*, 2018; LOPES GROTTTO *et al.*, 2020). No entanto, ao mesmo tempo que a industrialização traz progresso e modernização, e traz vantagens para a organização e o bem-estar social, ela também produz fatores importantes que levam ao esgotamento dos recursos naturais (DE VARGAS MORES *et al.*, 2018; LOPES GROTTTO *et al.*, 2020). As consequências desses padrões de produção e consumo têm levado a sociedade a buscar por novos processos inseridos na "tecnologia verde" que causem menos danos ao meio ambiente (DE VARGAS MORES *et al.*, 2018; YAP *et al.*, 2021).

Os conceitos de biorrefinaria são essenciais para moldar a economia do futuro e atender aos apelos por processos mais sustentáveis, reduzindo o uso de matérias-primas fósseis e não renováveis (BAUER; KRUSE, 2019; RAJESH BANU *et al.*, 2021). As biorrefinarias são instalações sustentáveis, com uma ampla gama de tecnologias de conversão, como termoquímica, bioquímica e crescimento de micro-organismos capazes de transformar a biomassa, incluindo resíduos agrícolas, materiais lenhosos, resíduos sólidos municipais e colheitas de alimentos (milho, sementes oleosas, beterraba sacarina e cana), em seus componentes mais simples (proteínas, açúcares, triglicerídeos, entre outros) (BAUER; KRUSE, 2019; KAPANJI; FARZAD; GÖRGENS, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; RAJESH BANU *et al.*, 2021). O principal objetivo da introdução do conceito de biorrefinaria é converter produtos de base biológica em biocombustíveis, produtos da química fina, energia e produtos de valor agregado (DA COSTA *et al.*, 2021).

Grandes esforços experimentais são feitos para testar a produção de bioprodutos derivados da lignocelulose, que estão presentes em quantidades abundantes no meio ambiente (ISONI *et al.*, 2018; PRASANTH *et al.*, 2021). A biomassa lignocelulósica é uma das principais fontes renováveis de carbono,

que pode compensar/substituir matérias-primas de origem fóssil (RAJESH BANU *et al.*, 2021).

O ácido levulínico é um dos principais produtos químicos obtidos da biomassa vegetal, que tem sido frequentemente sugerido como um material de partida para um grande número de compostos (THAKKAR *et al.*, 2021; YA'AINI; AMIN; ASMADI, 2012). Também é conhecido como ácido 4-oxopentanóico, b-ácido acetilpropiónico e c-ácido etovalérico, é um importante intermediário para produtos químicos finos e produção de solventes (YA'AINI; AMIN; ASMADI, 2012; ZHOU *et al.*, 2018). Entre produtos derivados do Ácido levulínico, os ésteres de ácido levulínico são um importante composto de plataforma, versáteis e ampla aplicação. O levulinato por exemplo pode ser usado não apenas na indústria de perfumes, mas também como substrato para várias reações orgânicas (TIAN *et al.*, 2021). A produção industrial dos ésteres de ácido levulínico, atualmente, envolve o uso de reagentes/produtos químicos perigosos e condições de temperatura de reação adversas que são consideradas metodologias não renováveis, além de violarem os princípios da química verde e sustentável (BADGUJAR; BADGUJAR; BHANAGE, 2020). Tais processos ainda apresentam desvantagens como condição altamente ácida e processo de fluxo contínuo pesado, entre outros (THAKKAR *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2018).

Deste modo se faz necessário o uso de processos biotecnológicos para mitigar os inconvenientes causados pelos processos tradicionais de produção de ésteres de ácido levulínico. Os processos enzimáticos surgem como uma alternativa aos processos químicos clássicos e geralmente permitem maior eficiência energética e produção em comparação com a rota tradicional. Outra característica que vale ressaltar é que as enzimas são extraídas de recursos renováveis, são atóxicas e seletivas evitando a formação paralela de outros produtos (BARBOSA *et al.*, 2021). O uso da biocatálise, processo que aproveita as vantagens de alta seletividade e reatividade de enzimas, pode catalisar a transformação de ácido levulínico em vários compostos de interesse industrial (JIA; LIU; QI, 2020).

Para a produção enzimática de éster de ácido levulínico é utilizada a lipase, uma enzima amplamente utilizada para catalisar reações de hidrólise, alcoólise, esterificação e transesterificação (ZHOU *et al.*, 2018). A aplicação de enzimas em processos industriais depende de seu desempenho operacional,

porém suas aplicações em forma solúvel (livres) costumam ser dificultadas pela baixa estabilidade, alto custo e inviabilidade de reciclagem e reutilização em ciclos catalíticos contínuos (BARBOSA *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2018). Com o intuito de superar tais desvantagens, diversas estratégias têm sido utilizadas na imobilização de lipases, conferindo alta estabilidade, facilitando a recuperação e permitindo sua reutilização em etapas de reciclo (JIA; LIU; QI, 2020; QUAYSON *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2018).

Os protocolos mais comumente usados para imobilização enzimática são adsorção, ligação covalente, encapsulação e enzimas reticuladas – *cross-linked enzyme aggregates* (CLEAs) (ALMEIDA *et al.*, 2021; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Adsorção é uma técnica simples e de baixo custo usada para ligar a enzima a um suporte por meio de forças fracas, como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio, eletrostática e interações hidrofóbicas (ALMEIDA *et al.*, 2021; BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Adsorção via interações hidrofóbicas, foi o método utilizado na presente estudo, devido suas aplicações industriais, baixo valor econômico e fácil realização em grande escala (MOKHTAR *et al.*, 2020).

Neste contexto, a presente Dissertação de Mestrado teve como objetivo principal propor um processo para a produção enzimática de um éster de interesse industrial (levulinato de isoamila) utilizando produtos químicos oriundos de biomassa – ácido levulínico (AL) e álcool isoamílico (AI) como materiais de partida. Esse álcool é o principal componente do óleo fúsel (cerca de 70-90% em massa), um subproduto obtido na produção industrial de bioetanol (CERÓN *et al.*, 2018; DIAS *et al.*, 2021). A utilização desses materiais de partida é uma importante forma de tornar a produção industrial de ésteres de interesse industrial de forma mais sustentável e mais próximo ao conceito de Biorrefinaria. Para a execução desse trabalho, foi preparado um biocatalisador pela imobilização de Eversa® Transform 2.0, uma lipase de baixo custo (US\$ 20 o Kg) obtida de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *Aspergillus oryzae* (COPPINI *et al.*, 2019; MONTEIRO *et al.*, 2021a; WANCURA *et al.*, 2021) em partículas PSty-DVB. Esse biocatalisador heterogêneo foi selecionado devido à sua alta atividade catalítica e reuso na produção de ésteres com propriedades lubrificantes (CARVALHO *et al.*, 2021; GUEDES JÚNIOR *et al.*, 2022). A produção enzimática deste éster ainda é pouco relatada na literatura (SALVI;

YADAV, 2019). Dessa forma, este estudo é original e sua execução pode ser uma opção interessante para a produção de ésteres industriais a partir de materiais renováveis (ácido levulínico e álcool isoamílico).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BIORREFINARIA

Por razões de sustentabilidade, cada vez mais empresas químicas estão tentando produzir solventes e produtos químicos finos a partir da biomassa e, ao mesmo tempo, para reduzir a dependência de produtos de base fóssil devido a preocupações com o esgotamento de matérias-primas não renováveis (CHATURVEDI *et al.*, 2020; ISONI *et al.*, 2018; KISS *et al.*, 2016). Apesar do crescente interesse em bioeconomia e energia renovável, a indústria de biorrefinaria tem se esforçado para alcançar a competitividade econômica (THAKKAR *et al.*, 2021).

As biorrefinarias combinam as tecnologias necessárias entre matérias-primas biológicas e intermediários industriais e produtos finais. A biorrefinaria é baseada na química tradicional de síntese, e este campo foi profundamente estudado por quase um século (CHATURVEDI *et al.*, 2020). A síntese de processos químicos continua a se desenvolver ao longo do tempo para determinar as rotas de processamento necessárias para produzir produtos de consumo, a determinação das reações químicas envolvidas, a seleção e o projeto das operações unitárias envolvidas nas rotas de processamento, o cálculo de utilidades e resíduos, emissões, entre outros (CHATURVEDI *et al.*, 2020; VIRGÍNIA MARQUES; SANTOS; PEREIRA, [s.d.]).

O biorrefinamento inclui uma ampla gama de tecnologias de conversão, como termoquímica, bioquímica e crescimento de micro-organismos capazes de transformar a biomassa, incluindo resíduos agrícolas, materiais lenhosos, resíduos sólidos municipais e colheitas de alimentos (milho, sementes oleosas, beterraba sacarina e cana), em seus componentes mais simples (proteínas, açúcares, triglicerídeos, entre outros) (BAUER; KRUSE, 2019; KAPANJI; FARZAD; GÖRGENS, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; RAJESH BANU *et al.*, 2021; VIRGÍNIA MARQUES; SANTOS; PEREIRA, [s.d.]). Existem muitas definições de biorrefinaria, no entanto, uma interpretação livre de biorrefinaria, pela *International Energy Agency: IEA* é “o processamento sustentável de biomassa em um espectro de produtos comercializáveis e energia”(CHAVES ALVIM; L SILVA-ALVIM; MACHADO DE OLIVEIRA, 2016). O principal objetivo dessas

atualizações é converter produtos de base biológica em biocombustíveis, produtos químicos, energia e produtos de valor agregado (DA COSTA *et al.*, 2021).

A biorrefinaria pode ser classificada de acordo com a sua fase como: a biorefinaria de fase I que, por exemplo, seriam usinas de etanol de moagem a seco (KAMM; KAMM, 2004; MAZZEI *et al.*, 2021). Utiliza uma única matéria-prima, tem capacidade de processamento fixa e produz um único produto. Um exemplo da biorrefinaria de fase II é a tecnologia de moagem úmida. Com a finalidade de produzir vários produtos finais, a fase II utiliza também uma única matéria-prima. Esses produtos incluem amido, xarope de milho com alto teor de frutose, etanol, óleo de milho e ração e farinha de glúten de milho (KAMM; KAMM, 2004; MAZZEI *et al.*, 2021). A biorrefinaria de fase III, seria uma mistura de biomassa de tipos de matéria-primas e métodos de processamentos para produção de uma multiplicidade de produtos químicos, contendo um mix de tecnologia para o setor industrial (KAMM; KAMM, 2004; MAZZEI *et al.*, 2021).

Com base no uso da matéria-prima, é possível classificar as biorrefinarias em quatro diferentes gerações de desenvolvimento como pode ser observado na Figura 1 (LIU *et al.*, 2021). Na primeira geração, empregava uma única matéria-prima e uma única tecnologia que envolve a esterificação, transesterificação e fermentação de material vegetal para produzir produtos limitados sendo as principais matérias-primas, materiais à base de amido ou açúcar: cana-de açúcar, palha de milho, palha de trigo, cevada, sorgo e girassol. Portanto, algumas dessas matérias-primas possam produzir biocombustíveis por exemplo, é preciso que uma grande quantidade de cereais seja consumida durante a produção, o que pode fazer com que os preços dos alimentos subam e sejam menos benéficos para o desenvolvimento econômico (LIU *et al.*, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; SHAHID *et al.*, 2021). Biorrefinaria de segunda geração, também usa uma única matéria-prima e tecnologia que engloba a hidrólise e fermentação de material lignocelulósico, mas pode produzir diversos produtos. São biocombustíveis produzidos a partir do processamento de safras não alimentícias (forragem, bagaço, resíduos sólidos, gordura animal, palha de trigo, palha de arroz, bagaço, talo de algodão, farelo de trigo, entre outros.) e são compostos principalmente de materiais lignocelulósicos (LIU *et al.*, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; SHAHID *et al.*, 2021). A terceira geração de biorrefinarias

apresenta uma melhoria considerável em relação às duas gerações, podendo produzir diferentes produtos a partir de diversas matérias-primas e utiliza diferentes tecnologias por meio de processos bioquímicos e termoquímicos, para atender às versáteis demandas do mercado (LIU *et al.*, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; SHAHID *et al.*, 2021). A biorrefinaria de terceira geração diz respeito à produção de biocombustíveis a partir da biomassa de algas, por exemplo a partir de processos de transesterificação (por exemplo, transesterificação enzimática, catalisada por base, catalisada por ácido) (LIU *et al.*, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; SHAHID *et al.*, 2021). Desenvolvida com a de terceira geração, as biorrefinarias de quarta geração enfocam o uso de tecnologias biológicas avançadas, custo econômico e os benefícios ambientais do cultivo em grande escala de microalgas. Por exemplo, a produção de biocombustíveis a partir de biomassa de algas geneticamente modificadas se enquadra nos biocombustíveis de quarta geração (LIU *et al.*, 2021; MAZZEI *et al.*, 2021; SHAHID *et al.*, 2021).

Figura 1 – Visão geral das quatro gerações de biorrefinaria, considerando suas matérias-primas, produtos e imperfeições.

Primeira Geração	Segunda Geração	Terceira Geração	Quarta Geração
<ul style="list-style-type: none"> • Matéria-prima • Cana-de-açúcar • Palha de trigo • Palha de milho • milho • Produtos • Bio-óleos • Biocombustíveis • biogases • Imperfeições • Uma grande quantidade de cereais são consumidos no processo. 	<ul style="list-style-type: none"> • Matéria-prima • Lignocelulósica • Agroicultura • Resíduos Industriais • Resíduos florestais • Produtos • Bio-óleos • Biocombustíveis • Biogases • Energia • Eletricidade • Bioquímicos • Imperfeições • Embora as matérias-primas não se limitam a cereais, a produção é baixa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Matéria-prima • Organismos aquáticos (Microalgas e Macroalgas) • Produtos • Bio-óleos • Biocombustíveis • Biogases • Energia • Eletricidade • Bioquímicos • Fertilizantes • Imperfeições • O crescimento de microalgas requer a extração de nutrientes dos recursos fósseis, resultando no esgotamento de recursos não biofósseis. 	<ul style="list-style-type: none"> • Matéria-prima • Organismos aquáticos baseados no cultivo de eficiência solar (Microalgas e Macroalgas) • Produtos • Bio-óleos • Biocombustíveis • Biogases • Energia • Eletricidade • Bioquímicos • Fertilizantes • Imperfeições • O cultivo de algas em grande escala é limitado pelo alto custo.

Fonte: Adaptado de (LIU *et al.*, 2021).

Biomassa é um termo comum aplicado para explicar as fontes biológicas obtidas de animais e plantas, considerada como fonte de energia renovável, limpa e ecologicamente correta (HOANG *et al.*, 2021; SIWAL *et al.*, 2021). A biomassa lignocelulósica é uma das principais fontes renováveis de carbono, que pode compensar/substituir matérias-primas de origem fóssil, ou seja, apoiar o sequestro de carbono e a produção de bioenergia e bioprodutos (RAJESH BANU *et al.*, 2021).

A biomassa é composta principalmente de compostos lignocelulósicos, incluindo celulose, hemicelulose e lignina, que tem potencial como fonte de energia renovável (HOANG *et al.*, 2021; RAJESH BANU *et al.*, 2021). As principais fontes de biomassa que são simplesmente descartadas como resíduo, por exemplo, esterco de gado, resíduos agrícolas, resíduo florestal, resíduo industrial, resíduos de produção de biodiesel, resíduos de processamento marinho, resíduos de processamento de alimentos e resíduos agrícolas, podendo ser principalmente de palha de cevada, casca de coco, palha de milho, cacho de frutas vazio, arroz, bagaço de cana-de-açúcar, palha de trigo e madeira (RAJESH BANU *et al.*, 2021; SIWAL *et al.*, 2021). Existem vários métodos para o pré-tratamento de material de lignocelulose, como métodos convencionais, incluindo físicos, físico-químicos, químicos e biológicos, métodos avançados e os métodos em desenvolvimento (BULKAN; FERREIRA; TAHERZADEH, 2021; HOANG *et al.*, 2021; RAJESH BANU *et al.*, 2021).

Aproximadamente 181,5 bilhões de toneladas de biomassa lignocelulósica são produzidas anualmente, respondendo por 90% da biomassa, da qual apenas cerca de 3% é efetivamente utilizada e incorporada à bioeconomia circular (RAJESH BANU *et al.*, 2021). Considerados como matéria-prima, os resíduos de biomassa têm potencial para grandes indústrias. Brasil é um dos maiores produtores commodities agrícolas e animais, que desde dos anos 90, foi o país que mais cresceu no seguimento em nível mundial e atualmente é líder em relação a produção e exportação (DE SOUZA NOEL SIMAS BARBOSA; HYTÖNEN; VAINIKKA, 2017). Toneladas de resíduos e desperdícios são produzidos no Brasil proveniente desse seguimento indústria, sendo assim um possível potencial para utilizar esses resíduos de biomassa para o uso de matéria-prima renováveis para biorrefinaria (DE SOUZA NOEL SIMAS

BARBOSA; HYTÖNEN; VAINIKKA, 2017; PATEL; SHAH, 2021; VIRGÍNIA MARQUES; SANTOS; PEREIRA, [s.d.]).

Tendo que a biorrefinaria utiliza de tecnologias para geração de produtos, a partir da biomassa de lignocelulose. Várias pesquisas e estudos experimentais relativos à produção de ácido levulínico a partir de biomassa têm sido realizados (ISONI *et al.*, 2018; PRASANTH *et al.*, 2021).

2.2 ÉSTERES DE ÁCIDO LEVULÍNICO

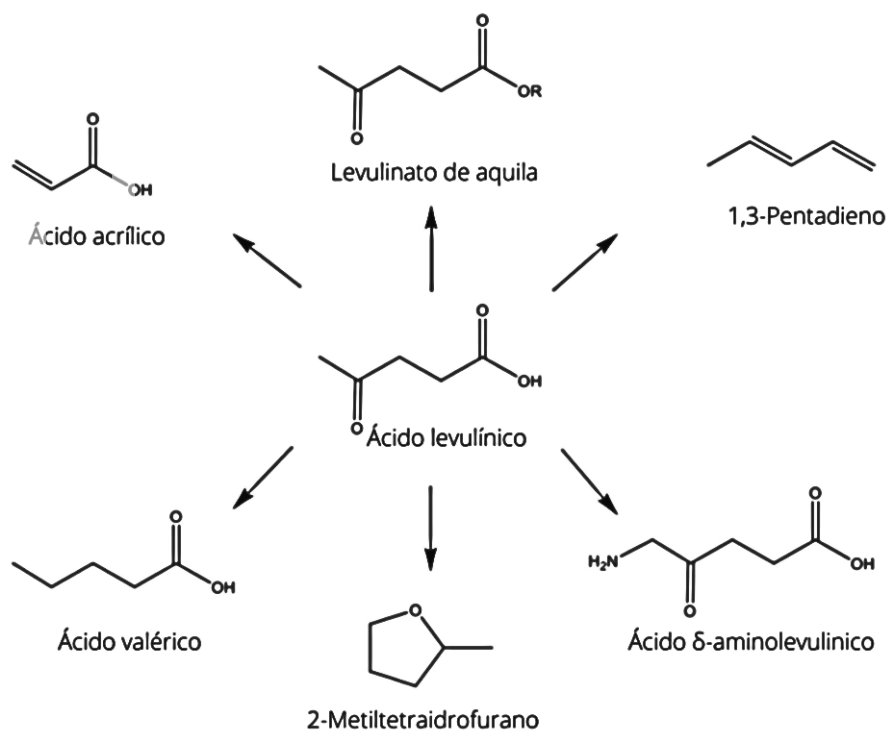
Os produtos químicos e biocombustíveis sintetizados a partir de várias matérias-primas renováveis, obtidos da biomassa, derivados de resíduos agrícolas é uma alternativa à matéria-prima não renovável para atender à demanda de energia do futuro (AN *et al.*, 2017; CHAFFEY *et al.*, 2021; ISONI *et al.*, 2018; JAISWAL; RATHOD, 2021; YAN *et al.*, 2015). A biomassa é a única fonte abundante e concentrada de carbono não fóssil disponível na Terra (KAPANJI; HAIGH; GÖRGENS, 2021; YAN *et al.*, 2015). A conversão de biomassa em produtos químicos orgânicos de valor agregado e em escala comercial tem sido o foco da indústria e dos pesquisadores na última década, por ser um processo muito atraente devido à sua facilidade de produção, mas também resolve o problema de destino para o resíduo agroindustrial (BADIA *et al.*, 2021; THAKKAR *et al.*, 2021; YAN *et al.*, 2015). Por exemplo os combustíveis fluidos da biomassa lignocelulósica principalmente, podendo ser de fontes de biomassa renováveis, o biodiesel e o bioetanol, devem se tornar um substituto promissores para os combustíveis diesel, e o biodiesel comercial padrão é composto principalmente de ésteres de ácidos graxos obtidos de plantas oleaginosas, como óleo de palma e vegetais (CHAFFEY *et al.*, 2021; GARCÍA *et al.*, 2021; JAISWAL; RATHOD, 2021; SALVI; YADAV, 2019; SHESTAKOVA *et al.*, 2021).

O ácido levulínico (ácido 4-oxopentanóico) contém uma cetona e um grupo de ácido carboxílico é um produto químico multiuso, versátil e um dos mais importantes precursores de blocos de construção, sendo atualmente de grande importância em diversas aplicações industriais (BADIA *et al.*, 2021; CHAFFEY *et al.*, 2021; SALVI; YADAV, 2019; SHESTAKOVA *et al.*, 2021). O desenvolvimento da produção industrial de ácido levulínico a partir de biomassa lignocelulósica

gerou interesse como um material de base biológica barato e prontamente disponível (GARCÍA *et al.*, 2021; ISONI *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2017; SHESTAKOVA *et al.*, 2021).

Apresentado no relatório do *US Department of Energy's*, como sendo um dos “10 mais importantes” para o desenvolvimento de tecnologias para a produção de base biológica a partir de carboidratos, utilizando conceitos de biorrefinaria. O ácido levulínico tem grupos funcionais presentes que o torna essencial para a síntese de compostos químicos, de valor agregado (JAISWAL; RATHOD, 2021; SALVI; YADAV, 2019). A figura 2 mostra algumas das aplicações relevantes que podem ser obtidas, como ésteres levulínicos, γ -valerolactona, 1,3-pentadieno e ácido valérico e ácido acrílico que tem grandes aplicações na indústria de aromas e fragrâncias, cosméticos, herbicidas, produtos farmacêuticos, agentes anticongelantes ou plastificantes e como componente na mistura em biodiesel e biocombustíveis (BADIA *et al.*, 2021; SALVI; YADAV, 2019; SCHMIDT *et al.*, 2017).

Figura 2 - Alguns derivados químicos obtidos do ácido levulínico.



Fonte: Adaptado de (BADIA *et al.*, 2021).

Os ésteres de ácido levulínico se destacam por terem uma ampla aplicação e possuir uma grande quantidade de derivados (AN *et al.*, 2017; BADIA *et al.*, 2021; SCHMIDT *et al.*, 2017; THAKKAR *et al.*, 2021). BOZELL; PETERSEN, 2010 reforçaram que o ácido levulínico é uma das principais moléculas da plataforma derivada da biomassa, por ser facilmente fabricado a partir de resíduos lignocelulósicos e tendo um custo relativamente barato devido à sua excelente reatividade (SALVI; YADAV, 2019; YAN *et al.*, 2015).

O etil levulinato se destaca entre os derivados do ácido levulínico por seu excelente desempenho como aditivo de combustível de nova geração, com maior eficiência do motor e menores emissões de monóxido de carbono (CO) e óxidos de nitrogênio (Nox), além de produzir potencial de polímeros biodegradáveis (como o policarbonato) (WU *et al.*, 2021). Outro derivado proeminente do ácido levulínico é o levulinato de alquila, que são mais comumente usados na indústria de aromas e fragrâncias e recentemente receberam atenção considerável como um aditivo de combustível promissor para melhorar a eficiência do motor e reduzir as emissões prejudiciais (BADIA *et al.*, 2021; SALVI; YADAV, 2019). Eles também podem melhorar algumas propriedades físicas e químicas, como viscosidade, compressibilidade e ponto de fluidez e ponto de turvação, para realizar as funções de lubrificação, limpeza e estabilização do combustível (BADIA *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021).

Tradicionalmente, esses ésteres são sintetizados pela adição de catalisadores ácidos homogêneos em altas temperaturas, o que não é ecologicamente correto (ISONI *et al.*, 2018; THAKKAR *et al.*, 2021). No entanto, o aprimoramento mais comum é a esterificação Fischer direta sob condições ácidas na presença de álcool para produzir ésteres de ácido levulínico, que são usados como solventes e plastificantes na indústria de aromatizantes de alimentos (CHAFFEY *et al.*, 2021; ISONI *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2017). Um outro método de aquisição e processo de tecnologia chamado Biofine (Biofine Renewables LLC Company) usa ácido sulfúrico diluído como catalisador (ISONI *et al.*, 2018; KAPANJI; HAIGH; GÖRGENS, 2021; SCHMIDT *et al.*, 2017). Na presença de ácido sulfúrico diluído, os ésteres são extraídos da lignocelulose por hidrólise (BADIA *et al.*, 2021; SCHMIDT *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2015). O

processo envolve um sistema de reator contínuo de dois estágios operando em condições ideais para produzir ésteres de ácido levulínico com um rendimento teórico de 70% a 80%, o que corresponde a um rendimento de massa de 50% com base nos açúcares C6 (BADIA *et al.*, 2021)

Recentemente em meio acadêmico uma atenção está muito grande voltada para a os métodos de obtenção de ésteres de ácido levulínico, sendo em rotas químicas e rota enzimática. Estudos feitos por R. An *et al* analisaram a atividade catalítica de uma série de sulfatos metálicos como catalisadores para a síntese de levulinato de butila a partir da frutose. Mostrando uma possível utilização com do férrico Fe^{2+} com um catalisador eficiente utilizando a base de diferentes carboidratos, incluindo glicose, celulose, inulina e sacarose (AN *et al.*, 2017). K. S. Jaiswal e V. K. Rathod utilizando uma abordagem “verde”, estudaram a síntese de levulinato de amila com *Candida antarctica lipase B* imobilizada na ausência de um solvente tóxico. O protocolo concluiu que o desenvolvimento da rota utilizando um catalisador verde e o sistema livre de solvente ofereceram benefícios consideráveis (JAISWAL; RATHOD, 2021). Um recente estudo abordou a atualização do ácido levulínico para a produção de levulinato de metila por meio de uma abordagem enzimática verde. Avaliando o potencial de várias lipases, a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) imobilizadas demonstrou o melhor rendimento, utilizando o hexafluorofosfato de 1- butil-3-metilimidazólio como solvente, mostrando assim um potencial ao suprimir a atividade de hidrólise da reação (DI *et al.*, 2019).

No campo da catálise, vários catalisadores heterogêneos recicláveis (ácido sólido, nano-catalisador, biocatalisador entre outros.) receberam grande consideração devido às suas características típicas, como robustez à atividade catalítica, estabilidade ao meio de reação, reutilização e facilidade de aplicabilidade (BADGUJAR; BADGUJAR; BHANAGE, 2020). Esses catalisadores de ácido sólido são de vários tipos e podem ser usados de acordo com sua aplicabilidade prática, como base de silicato, base de tungstênio, base de sal de metal, base de resina e nano estruturado, entre outros (BADGUJAR; BADGUJAR; BHANAGE, 2020). Catalisadores químicos proporcionaram rendimento significativo, mas o esquema catalítico sofre de desvantagens, como alto custo, poluição, necessidade de temperatura mais alta, alto consumo de energia, condição altamente ácida, método de fluxo contínuo massivo,

sensibilidade à umidade, tempo de reação prolongado, menor rendimento e problema de reciclabilidade (JAISWAL; RATHOD, 2021; SALVI; YADAV, 2019; SONG *et al.*, 2021; ZHONG *et al.*, 2020).

Com o intuito de superar as desvantagens mencionadas, o uso de biocatalisadores apresenta um potencial a realizar várias conversões orgânica (JAISWAL; RATHOD, 2021). Utilização de um meio de reação catalisada por enzimas é uma alternativa promissora, exemplos podem ser observados na Tabela 1. As lipases apresentam funções significativas, para um esquema ecológico, tendo vários benefícios sobre a síntese química tradicional (SALVI; YADAV, 2019; SOUSA *et al.*, 2021).

Tabela 1 - Exemplos de sínteses de compostos a partir de ácido levulínico derivado de biomassa usando sistemas catalisados por lipases.

(Continua)

ÉSTER PRODUZIDO	CATALISADOR	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO	CONDIÇÕES	RENDIMENTO/ CONVERSÃO (%)	TEMPO DE REAÇÃO	REFERÊNCIAS
Levulinato de butila	CALB imobilizadas em Nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) e Politefluoroetileno (Teflon, PTFE).	Ativação interfacial	Esterificação de LA com álcool em sistemas com solvente (ciclohexano): Razão molar 1:2, 20 °C a 250 rpm.	99%	45 min	(SZELWICKA <i>et al.</i> , 2021)
Levulinato de etila	<i>Candida rugosa</i> imobilizada em um suporte ternário composto por nanocelulose derivada opfl (NC) e montmorillonite (MMT) em alginato (ALG) (CRL-ALG/NC/MMT).	Ligação covalente	Esterificação de LA com álcool em sistemas sem solvente: molar 1:2, 35 °C a 200 rpm.	92,89 %	7h	(MOHD HUSSIN; ATTAN; WAHAB, 2020)
Levulinato de etila	<i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada em nanopartículas de AgAu-Fe3O4@tartaric.	Confinamento	Esterificação de LA com álcool em sistemas sem solvente razão álcool para ácido levulínico (4:1) a 45°C.	90 %	12h	(RANZI <i>et al.</i> , 2020)

(Continua)

Éster produzido	Catalisador	Métodos de imobilização	Condições	Rendimento/ Conversão (%)	Tempo de Reação	Referências
Levulinato de butila	LipR2 (<i>Alkalispirillum sp</i>) imobilizada em Florisil funcionalizado com glutaraldeído.	Ligação covalente	Esterificação de LA com álcool em sistemas sem solvente razão álcool para ácido levulínico (10:1) a 55 °C.	45,9%	12H	(MESBAH, 2019)
Levulinato de butila	CALB imobilizada em 3DOM/m-OS.	Adsorção hidrofóbica	Esterificação de razão molar de álcool para LA (1:10) sistemas sem solvente a 40°C	74,5%	12h	(ZHOU <i>et al.</i> , 2018)
Levulinato de hexila	CALB imobilizada em immovead-150	Ligação covalente	Esterificação de razão molar de álcool para LA (4:7) sistemas com solvente (tert-butilmetil éter), 45°C a 200 rpm	96%	8h	(BADGUJAR; BHANAGE, 2015)
Levulinato de amila	CALB imobilizada em contas de poliacrilato	Ligação covalente	Esterificação de LA com álcool em sistemas sem solvente razão álcool para ácido levulínico (1:3), 50°C a 250 rpm.	73,2 %	10h	(JAISWAL; RATHOD, 2021)

(Conclusão)

Éster produzido	Catalisador	Métodos de imobilização	Condições	Rendimento/ Conversão (%)	Tempo de Reação	Referências
Éster de 1,4-butanodiol	Novozym 435 imobilizada em um suporte hidrofóbico (resina acrílica)	Adsorção hidrofóbica	Esterificação de LA com álcool em sistemas sem solvente razão álcool-ácido de 1:2,4 a 50°C.	87,33%	7h	(ZHAI <i>et al.</i> , 2022)
Levulinato de butila	CALB imobilizada em nanoflowers	Ligação covalente	Esterificação de LA com álcool em sistemas sem solvente razão álcool-ácido de 1:5, 40 °C a 170 rpm	85,48%	24h	(GAO <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Autor

2.3 LIPASES

As lipases (hidrolases de éster de triacilglicerol - EC 3.1.1.3) exemplo mais estudado de enzimas com aplicações em bioprocessos, são biomoléculas lipolíticas que catalisam a hidrólise e total ou parcial de triacilglicerol fornecendo diacilglicerol, monoacilglicerol, glicerol e ácidos graxos livres (JACOB; SUTHINDHIRAN, 2020). Sendo mais comum sua função de hidrólise, as lipases podem catalisar uma ampla gama de reações, incluindo esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise, acidólise e aminólise (RODRIGUES *et al.*, 2019). Essas enzimas são pertencentes da classe serina hidrolase da superfamília α/β -hidrolase e contêm a tríade de aminoácidos característica Ser-Asp (Glu)-His no sítio ativo (ALMEIDA *et al.*, 2021).

A química industrial moderna está se movendo em direção a processos "mais verdes" e à produção de substratos cada vez mais complexos e vem sendo usadas para substituir vários catalisadores químicos na química orgânica moderna devido às suas amplas atividades quimobiológicas (RODRIGUES *et al.*, 2019). Essa demanda produziu um ímpeto claro para a biocatálise, porque é uma forma de maximizar a economia, usando a seletividade e especificidade das enzimas (JACOB; SUTHINDHIRAN, 2020). As lipases apresentam características que justifica a sua maior utilização para biotransformações em meio industrial pelos motivos de, eles não requerem a presença de cofatores, são muito robustos, com alta atividade, estabilidade em uma ampla gama de condições, de meio aquoso a meio anidro, e também em neomídia (líquidos iônicos, fluidos supercríticos ou solventes eutéticos profundos), têm uma baixa especificidade e reconhecem muitos substratos diferentes, mas simultaneamente, em muitos casos, com uma alta seletividade (MONTEIRO *et al.*, 2021b). Apresentando essas vantagens utilizando as lipases, é possível obter produtos de alto valor agregado para as indústrias (THAKKAR *et al.*, 2021). Essa versatilidade pode ser aplicada a muitos campos, como alimentos, biomedicina, cosméticos, biossensores, bebidas, biodegradação, química, polímeros, detergentes, papel, couro e combustíveis. A lipase também é usada para produzir biodiesel, ésteres com sabor e lipídios estruturados (ALMEIDA *et al.*, 2021; GUO *et al.*, 2021).

Estas enzimas encontram-se largamente distribuídas na natureza sendo universal em quase todos os organismos vivos (QUAYSON *et al.*, 2020). Para catálise, as lipases são isoladas principalmente de três formas vegetais, animais e microrganismos (QUAYSON *et al.*, 2020). Sendo as de vegetais em maior concentração em frutos, folhas, sementes e látex. Lipases de origem animal podem ser obtidas principalmente de glândulas e órgãos excretórios como pâncreas. As lipases de microrganismos são mais utilizadas na indústria porque, além de um método mais simples de separá-las do caldo de fermentação, geralmente são mais estáveis e possuem propriedades mais diversas do que as lipases de outras fontes (ZHONG *et al.*, 2020). A maioria delas extracelulares, o que é propício para sua extração, separação e purificação. Algumas fontes de lipase recentemente identificadas incluem subprodutos e resíduos agrícolas e agroindustriais que possuem boa fonte de enzimas.

As lipases têm sido consideradas como um dos mais importantes biocatalisadores industriais para aplicação biotecnológica (ALMEIDA *et al.*, 2021). Tendo em conta, que as lipases são catalisadores biológicos que foram projetados para cumprir uma função fisiológica, podem apresentar algumas desvantagens em sua forma livre (RODRIGUES *et al.*, 2019). Para interesse industrial as lipases apresentam algumas propriedades não vão de acordo com os requisitos exigidos, como a fraca estabilidade, inibidos por componentes da reação ou solúveis em água e especificidade da enzima na reação aplicada (RODRIGUES *et al.*, 2019). Além disso, pode ter dificuldade na sua aplicação em larga escala, elevados custos e não podem ser facilmente recuperadas ou reutilizadas ao final da reação, o que dificulta a separação do produto limitam sua aplicação em processos industriais (GUO *et al.*, 2021). Portanto, a fim de mitigar esses inconvenientes, os processos de imobilização surgem principalmente como uma estratégia para aumentar a estabilidade do biocatalisador e facilitar as etapas de recuperação/reutilização (ZHONG *et al.*, 2020).

2.4 PRINCIPAIS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

A imobilização de enzimas é de importância primordial e envolve uma denominada enzima fisicamente confinada em uma superfície de uma matriz insolúvel (suporte) é um método atraente para aumentar a estabilidade operacional e reaproveitamentos da enzima, e torna o processo de biocatálise mais competitivo (JIA; LIU; QI, 2020; QUAYSON *et al.*, 2020; SALVI; YADAV, 2019).

Os métodos de imobilização de proteínas exploram as propriedades físicas e químicas das cadeias laterais dos aminoácidos que os compõem, como acidez, alcalinidade e polaridade. Portanto, o método de fixação é baseado nos diferentes tipos de conexões e/ou interações que podem ser feitas com o suporte.

Sendo um avanço no campo de biotecnologia a imobilização de biomoléculas, provou ser uma poderosa ferramenta para melhorar muitos recursos enzimáticos e traz uns importantes melhoramentos na utilização em meio industrial e deve buscar a melhoria de algumas das outras limitações da enzima, como sua estabilidade, especificidade, seletividade ou resistência aos inibidores e reagentes químicos possibilidade de reaproveitamento e a facilidade de separá-las do meio de reação, assim não tendo a contaminação do produto final (QUAYSON *et al.*, 2020; SALVI; YADAV, 2019). Curiosamente, a imobilização é compatível com qualquer outra estratégia projetada para melhorar a usabilidade da enzima. Dessa forma, a imobilização de enzimas tornou-se muito etapa proeminente no projeto de um biocatalisador enzimático industrial.

As biomoléculas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos, adsorção física por interação hidrofóbica ou iônica, encapsulação, ligação covalente e CLEA (ALMEIDA *et al.*, 2021). A seleção do sistema de imobilização mais adequado deve ser baseada em vários parâmetros, semelhantes ao melhor esforço para imobilizar a enzima, estabilidade funcional, baixo custo, a toxina final do reagente e a parte necessária para paralisar o biocatalisador. As principais características a serem observadas nas opções de suporte para uma dada operação são área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia e composição, natureza hidrofílica ou hidrofóbica,

resistência mecânica, custo, entre outros (FURLANI *et al.*, 2020). Eles podem ser caracterizados pela sua morfologia como materiais porosos, não porosos e semelhantes a gel, e como suportes orgânicos e inorgânicos (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

Os materiais porosos possuem uma grande área de superfície interna que pode ser usada para imobilização de enzimas, onde fica protegida contra uma agitação violenta (ZHONG *et al.*, 2020). Como a maior parte da área disponível para imobilização está em sua estrutura interna, deve-se notar que na sua área periférica, o tamanho dos poros deve ser grande o suficiente para acomodar a enzima e permitir a entrada das partículas do substrato.

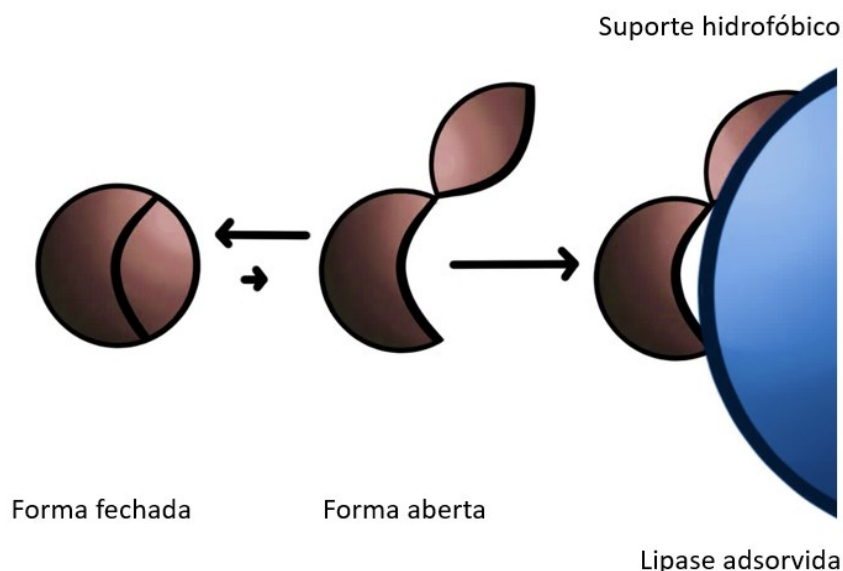
Esses suportes têm sido amplamente utilizados para imobilizar lipases e podem ser obtidos a partir de materiais orgânicos ou inorgânicos - de fontes naturais ou sintéticas. Os polímeros sintéticos exibem várias formas físicas e estruturas químicas e podem ser combinados para preparar vários transportadores. Os polímeros naturais são geralmente acessíveis, degradáveis e não causarão danos à terra. Dentre os diferentes carreadores orgânicos usados para imobilizar a lipase, destacam-se agarose, hidrogel de quitosana, resina acrílica e poli(estireno-divinilbenzeno) (SALVI; YADAV, 2019). Materiais inorgânicos semelhantes a sílica, alumina, titânia, zircônia, zeólita e manchas encantadoras também se destacam como suportes devido à sua grande área de superfície / tamanho de separação e excelentes peças mecânicas. A estabilidade de incubação é alta, e uma variedade de materiais compostos quimicamente funcionalizados podem ser usados, semelhante a agentes de acoplamento alcoxissilano ou líquidos iônicos (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021).

A adsorção física é um método de imobilização reversível bastante utilizado devido à sua simplicidade e baixo custo. Ele tem como vantagem na facilidade e simplicidade da técnica que permite a imobilização sob condições brandas, promover a estabilidade é a melhoria da atividade catalítica, preservação da conformação tridimensional da enzima, a possibilidade de alta retenção da atividade enzimática não tendo modificações estruturais na biomolécula e, a reversibilidade que permite a reutilização dos suportes por dessorção de enzimas inativas (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). A adsorção

pode apresentar diferentes tipos de ligações, como forças de Van der Waals, ligação hidrogênio e interações iônicas e hidrofóbicas (ZHONG *et al.*, 2020). O tipo de interação depende dos grupos funcionais presentes na superfície de suporte e a composição de aminoácidos ácidos presentes nas superfícies de lipase.

A adsorção via interação hidrofóbica é o protocolo de imobilização mais frequentemente utilizado para lipases de diferentes fontes devido ao seu mecanismo peculiar de ativação interfacial da enzima em superfícies hidrofóbicas (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Figura 3 – Lipase imobilizada via ativação interfacial em suporte hidrofóbico.



Fonte: Autor

A maioria das lipases tem uma estrutura que inclui uma cadeia polipeptídica que tem uma face hidrofóbica e uma face hidrofílica, que pode alterar a conformação da lipase em meio aquoso: sendo a forma fechada das lipases, quando área hidrofóbica da tampa interage com as áreas hidrofóbicas ao redor do centro ativo, isolando-o de o meio de reação tornando a lipase inativa e uma conformação aberta quando não tem essa interação da face hidrofóbica e hidrofílica portanto a sitio ativo fica acessível a moléculas de substrato (Figura

3) (MONTEIRO *et al.*, 2021b; QUAYSON *et al.*, 2020). Esse método de imobilização envolve apenas a porcentagem de moléculas de lipase que estão na forma monomérica e aberta, dando como resultado a imobilização da forma aberta da lipase monomérica. Por esse motivo, esta etapa é chamada de ativação interfacial (RODRIGUES *et al.*, 2019). Abertura da lipase se torna desnecessária, por outras interfaces externas, tornando-se uma garantia de imobilização de as lipases na forma monomérica e aberta, ativa. A estrutura exata e propriedades do suporte podem condicionar as propriedades finais das lipases, existem alguns trabalhos sugerindo que as condições de imobilização também podem alterar as características finais da enzima catalítica. Concluindo que a imobilização de lipase em suporte hidrofóbico é atribuída à ativação interfacial da lipase versus a superfície hidrofóbica dos suportes, isso significa que as lipases se tornam adsorvidos nos suportes hidrofóbicos (RODRIGUES *et al.*, 2019). Ou seja, imobilização de lipase em suporte hidrofóbico não segue uma adsorção hidrofóbica convencional, mas é um reconhecimento de pseudoafinidade da superfície hidrofóbica do suporte (RODRIGUES *et al.*, 2019).

Esse método de imobilização apresenta muitas vantagens. O primeiro é que é muito simples, pode ser realizado em quase qualquer pH (desde que a enzima é solúvel e estável), é muito rápido, facilmente reveste a superfície de suporte com enzima sem qualquer tratamento enzimático e mesmo apresentando fortes ligações o procedimento de imobilização em suporte hidrofóbico, podem ter o reaproveitamento do seu suporte utilizando um detergente para dissolver essas ligações (RODRIGUES *et al.*, 2019). Porém, esse protocolo tem um importante problema, enzimas podem ser liberadas para o meio sob certas condições, produzindo inativação operacional do biocatalisador (BOLINA; GOMES; MENDES, 2021). Sendo relatado que as lipases podem ser liberadas do suporte em alta temperatura, embora não esteja claro se as enzimas são liberadas do suporte e, em seguida, inativadas ou se a lipases se tornam inativada e posteriormente é então liberado para o meio (RODRIGUES *et al.*, 2019). Com base em todas as informações relatadas nessa revisão, o presente estudo tem a finalidade principal de desenvolver um processo para a produção sustentável de um éster (levulinato de isoamila) catalisada por Eversa® Transform 2.0 imobilizada via ativação interfacial.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, F. L. C. *et al.* **Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis.** *Process Biochemistry* Elsevier Ltd, , 1 nov. 2021.
- AN, R. *et al.* Efficient one-pot synthesis of n-butyl levulinate from carbohydrates catalyzed by Fe₂(SO₄)₃. *Journal of Energy Chemistry*, Henan, v. 26, n. 3, p. 556–563, 1 maio 2017.
- BADGUJAR, K. C.; BADGUJAR, V. C.; BHANAGE, B. M. **A review on catalytic synthesis of energy rich fuel additive levulinate compounds from biomass derived levulinic acid.** *Fuel Processing Technology* Elsevier B.V., , 1 jan. 2020.
- BADGUJAR, K. C.; BHANAGE, B. M. Thermo-chemical energy assessment for production of energy-rich fuel additive compounds by using levulinic acid and immobilized lipase. *Fuel Processing Technology*, v. Mumbai, 138, p. 139–146, 30 maio 2015.
- BADIA, J. H. *et al.* Optimization and green metrics analysis of the liquid-phase synthesis of sec-butyl levulinate by esterification of levulinic acid with 1-butene over ion-exchange resins. *Fuel Processing Technology*, v. Barcelona, 220, 1 set. 2021.
- BARBOSA, M. S. *et al.* Biolubricant production under zero-waste Moringa oleifera Lam biorefinery approach for boosting circular economy. *Industrial Crops and Products*, Aracaju, v. 167, 1 set. 2021.
- BAUER, M. C.; KRUSE, A. **The use of dimethyl ether as an organic extraction solvent for biomass applications in future biorefineries: A user-oriented review.** *Fuel* Elsevier Ltd, Stuttgart, 15 out. 2019.
- 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* Springer, , 2021.
- BOZELL, J. J.; PETERSEN, G. R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy’s “top 10” revisited. *Green Chemistry*, Knoxville, v. 12, n. 4, p. 539–55, 6 abr. 2010.
- BULKAN, G.; FERREIRA, J. A.; TAHERZADEH, M. J. Retrofitting analysis of a biorefinery: Integration of 1st and 2nd generation ethanol through organosolv pretreatment of oat husks and fungal cultivation. *Bioresource Technology Reports*, v. 15, 1 set. 2021.
- CARVALHO, W. C. A. *et al.* 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 catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, p. 106302, 1 dez. 2021.

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, p. 166–172, 1 dez. 2018.

CHAFFEY, D. R. *et al.* Conversion of levulinic acid to levulinate ester biofuels by heterogeneous catalysts in the presence of acetals and ketals. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 293, 15 set. 2021.

CHATURVEDI, T. *et al.* Developing process designs for biorefineries- definitions, categories, and unit operations. **Energies**, v. 13, n. 6, 1 mar. 2020.

CHAVES ALVIM, J.; L SILVA-ALVIM, F. A.; MACHADO DE OLIVEIRA, E. Call for papers Journal of Bioenergy and Food Science View project Screening of cellulolytic bacteria of samples of ruminal content collected in a slaughterhouse View project. 2016.

COPA REY, J. R. *et al.* Evaluation of cogeneration alternative systems integrating biomass gasification applied to a Brazilian sugar industry. **Renewable Energy**, v. 178, p. 318–333, 1 nov. 2021.

COPPINI, M. *et al.* PRODUCTION OF METHYL ESTERS BY ENZYMATIC HYDROESTERIFICATION OF CHICKEN FAT INDUSTRIAL RESIDUE. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 2, p. 923–928, 30 set. 2019.

DA COSTA, M. B. T. *et al.* Beyond trees: Mapping total aboveground biomass density in the Brazilian savanna using high-density UAV-lidar data. **Forest Ecology and Management**, v. 491, 1 jul. 2021.

DE SOUZA NOEL SIMAS BARBOSA, L.; HYTÖNEN, E.; VAINIKKA, P. Carbon mass balance in sugarcane biorefineries in Brazil for evaluating carbon capture and utilization opportunities. **Biomass and Bioenergy**, v. 105, p. 351–363, 2017.

DE VARGAS MORES, G. *et al.* Sustainability and innovation in the Brazilian supply chain of green plastic. **Journal of Cleaner Production**, v. 177, p. 12–18, 10 mar. 2018.

DI, X. *et al.* Biocatalytic upgrading of levulinic acid to methyl levulinate in green solvents. **Process Biochemistry**, v. 81, p. 33–38, 1 jun. 2019.

DIAS, A. L. B. *et al.* Continuous production of isoamyl acetate from fusel oil under supercritical CO₂: A mass transfer approach. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 176, p. 23–33, 1 dez. 2021.

FURLANI, I. L. *et al.* **Enzyme immobilization: Concepts and effects on proteolysis.** **Quimica Nova** Sociedade Brasileira de Quimica, , 1 abr. 2020.

GAO, J. *et al.* Monodisperse core-shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v. 309, p. 70–79, 1 fev. 2017.

GARCÍA, A. *et al.* γ -valerolactone from levulinic acid and its esters: Substrate and reaction media determine the optimal catalyst. **Applied Catalysis A: General**, v. 623, 5 ago. 2021.

GUEDES JÚNIOR, J. G. E. *et al.* Design of a sustainable process for enzymatic production of ethylene glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 10, n. 1, p. 107062, 1 fev. 2022.

GUO, H. *et al.* Immobilization of lipase by dialdehyde cellulose crosslinked magnetic nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 287–296, 31 ago. 2021.

HOANG, A. T. *et al.* Acid-based lignocellulosic biomass biorefinery for bioenergy production: Advantages, application constraints, and perspectives. **Journal of Environmental Management**, v. 296, 15 out. 2021.

ISONI, V. *et al.* Biomass to levulinic acid: A techno-economic analysis and sustainability of biorefinery processes in Southeast Asia. **Journal of Environmental Management**, v. 214, p. 267–275, 15 maio 2018.

JACOB, J. J.; SUTHINDHIRAN, K. Immobilisation of lipase enzyme onto bacterial magnetosomes for stain removal. **Biotechnology Reports**, v. 25, 1 mar. 2020.

JAISSWAL, K. S.; RATHOD, V. K. Green synthesis of amyl levulinate using lipase in the solvent free system: Optimization, mechanism and thermodynamics studies. **Catalysis Today**, v. 375, p. 120–131, 1 set. 2021.

JIA, B.; LIU, C.; QI, X. Selective production of ethyl levulinate from levulinic acid by lipase-immobilized mesoporous silica nanoflowers composite. **Fuel Processing Technology**, v. 210, 15 dez. 2020.

KAMM, B.; KAMM, M. **Principles of biorefineries**. **Applied Microbiology and Biotechnology**, abr. 2004.

KAPANJI, K. K.; FARZAD, S.; GÖRGENS, J. F. Life cycle and sustainability assessments of biorefineries producing glucaric acid, sorbitol or levulinic acid annexed to a sugar mill. **Journal of Cleaner Production**, v. 295, 1 maio 2021.

KAPANJI, K. K.; HAIGH, K. F.; GÖRGENS, J. F. Techno-economics of lignocellulose biorefineries at South African sugar mills using the biofine process to co-produce levulinic acid, furfural and electricity along with gamma valeractone. **Biomass and Bioenergy**, v. 146, 1 mar. 2021.

KISS, A. A. *et al.* Separation technology—Making a difference in biorefineries. **Biomass and Bioenergy**, v. 95, p. 296–309, 1 dez. 2016.

LIU, Y. *et al.* **Review of waste biorefinery development towards a circular economy: From the perspective of a life cycle assessment.** *Renewable and Sustainable Energy Reviews* Elsevier Ltd, , 1 abr. 2021.

LOPES GROTTTO, C. G. *et al.* Energy potential of biomass from two types of genetically improved rice husks in Brazil: A theoretical-experimental study. *Biomass and Bioenergy*, v. 142, 1 nov. 2020.

MAZZEI, R. *et al.* **Enzyme catalysis coupled with artificial membranes towards process intensification in biorefinery- a review.** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 set. 2021.

MESBAH, N. M. Covalent immobilization of a halophilic, alkalithermostable lipase LipR2 on Florisil® nanoparticles for production of alkyl levulinates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 667, p. 22–29, 30 maio 2019.

MOHD HUSSIN, F. N. N.; ATTAN, N.; WAHAB, R. A. Taguchi design-assisted immobilization of *Candida rugosa* lipase onto a ternary alginate/nanocellulose/montmorillonite composite: Physicochemical characterization, thermal stability and reusability studies. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 136, p. 109506, 1 maio 2020.

MOKHTAR, N. F. *et al.* **The immobilization of lipases on porous support by adsorption and hydrophobic interaction method.** *Catalysts* MDPI AG, , 1 set. 2020.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renewable Energy*, v. 164, p. 1566–1587, 1 fev. 2021a.

MONTEIRO, R. R. C. *et al.* Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. *Catalysis Today*, v. 362, p. 141–154, 15 fev. 2021b.

PATEL, A.; SHAH, A. R. Integrated lignocellulosic biorefinery: Gateway for production of second generation ethanol and value added products. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, v. 6, n. 2, p. 108–128, maio 2021.

PRASANTH, S. M. *et al.* Application of biomass derived products in mid-size automotive industries: A review. *Chemosphere*, v. 280, 1 out. 2021.

QUAYSON, E. *et al.* Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 134, 1 dez. 2020.

RAJESH BANU, J. *et al.* Lignocellulosic biomass based biorefinery: A successful platform towards circular bioeconomy. *Fuel*, v. 302, 15 out. 2021.

RANZI, E. M. *et al.* Synthesis of Ethyl Levulinate by a New Bio-nanocatalyst. *Chemical Engineering Transactions*, v. 80, p. 307–312, 1 jun. 2020.

- RODRIGUES, R. C. *et al.* **Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions.** *Biotechnology Advances* Elsevier Inc., , 1 set. 2019.
- SALVI, H. M.; YADAV, G. D. Surface functionalization of SBA-15 for immobilization of lipase and its application in synthesis of alkyl levulinates: Optimization and kinetics. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 18, 1 mar. 2019.
- SCHMIDT, L. M. *et al.* Levulinic acid production integrated into a sugarcane bagasse based biorefinery using thermal-enzymatic pretreatment. *Industrial Crops and Products*, v. 99, p. 172–178, 1 maio 2017.
- SHAHID, M. K. *et al.* Biofuels and biorefineries: Development, application and future perspectives emphasizing the environmental and economic aspects. *Journal of Environmental Management*, v. 297, 1 nov. 2021.
- SHESTAKOVA, P. *et al.* Hybrid catalyst with combined Lewis and Brønsted acidity based on ZrIV substituted polyoxometalate grafted on mesoporous MCM-41 silica for esterification of renewable levulinic acid. *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 323, 1 ago. 2021.
- SIWAL, S. S. *et al.* Recovery processes of sustainable energy using different biomass and wastes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 150, 1 out. 2021.
- SONG, M. *et al.* The effect of enzyme loading, alcohol/acid ratio and temperature on the enzymatic esterification of levulinic acid with methanol for methyl levulinate production: A kinetic study. *RSC Advances*, v. 11, n. 25, p. 15054–15059, 22 abr. 2021.
- SOUSA, R. R. *et al.* **Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: A review from thermodynamic and kinetic perspectives.** *Catalysis Science and Technology* Royal Society of Chemistry, , 7 set. 2021.
- SZELWICKA, A. *et al.* PTFE-Carbon Nanotubes and Lipase B from *Candida antarctica*—Long-Lasting Marriage for Ultra-Fast and Fully Selective Synthesis of Levulinate Esters. *Materials* **2021**, v. 14, n. 6, p. 1518, 19 mar. 2021.
- THAKKAR, A. *et al.* Production of levulinic acid and biocarbon electrode material from corn stover through an integrated biorefinery process. *Fuel Processing Technology*, v. 213, 1 mar. 2021.
- TIAN, Y. *et al.* **A review on solid acid catalysis for sustainable production of levulinic acid and levulinate esters from biomass derivatives.** *Bioresource Technology* Elsevier Ltd, , 1 dez. 2021.
- VIRGÍNIA MARQUES, C.; SANTOS, D.; PEREIRA, D. **ASPECTOS PARA IMPLANTAÇÃO DE UMA BIORREFINARIA COMO ALTERNATIVA PARA MELHORAR A MATRIZ ENERGÉTICA ASPECTS FOR THE IMPLEMENTATION OF A BIORREFINARIA AS AN ALTERNATIVE TO**

IMPROVE THE ENERGY MATRIX. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.simprod.ufs.br>. Acesso em: 03 nov. 2021

WANCURA, J. H. C. *et al.* Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. **Journal of Cleaner Production**, v. 285, p. 124838, 20 fev. 2021.

WU, K. *et al.* Inter-integration reactive distillation with vapor permeation for ethyl levulinate production: Modeling, process analysis and design. **Chemical Engineering Science**, v. 245, 14 dez. 2021.

YA'AINI, N.; AMIN, N. A. S.; ASMADI, M. Optimization of levulinic acid from lignocellulosic biomass using a new hybrid catalyst. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 58–65, jul. 2012.

YAN, K. *et al.* **Production and catalytic transformation of levulinic acid: A platform for speciality chemicals and fuels.** **Renewable and Sustainable Energy Reviews** Elsevier Ltd, , 27 jul. 2015.

YAP, J. K. *et al.* A review manuscript submitted to Chemosphere advancement of green technologies: A comprehensive review on the potential application of microalgae biomass. **Chemosphere**, v. 281, 1 out. 2021.

ZHAI, S. *et al.* Enzymatic synthesis of a novel solid–liquid phase change energy storage material based on levulinic acid and 1,4-butanediol. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2022.

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** Elsevier B.V., , 1 jun. 2020.

ZHOU, L. *et al.* Conversion of levulinic acid into alkyl levulinates: Using lipase immobilized on meso-molding three-dimensional macroporous organosilica as catalyst. **Bioresource Technology**, Tianjin, v. 247, p. 568–575, 2018.

3 ARTIGO 1: Process Optimization for Enzymatic Production of a Valuable Biomass-Based Ester from Levulinic Acid

“Process Optimization for Enzymatic Production of a Valuable Biomass-Based Ester from Levulinic Acid”

Abstract

The present study consists in the enzymatic production of isoamyl levulinate, a biomass-based platform chemical with attractive properties for several applications, via esterification of levulinic acid (LA) and isoamyl alcohol (IA) in a solvent system. A low-cost liquid lipase (Eversa[®] Transform 2.0) immobilized via hydrophobic adsorption on mesoporous poly-styrene-divinylbenzene (PSty-DVB) beads was used as heterogeneous biocatalyst. This biocatalyst was prepared at low ionic strength (5 mmol.L⁻¹ buffer sodium acetate pH 5.0) and 25 °C using an initial protein loading of 40 mg.g⁻¹ of support. A maximum immobilized protein of 31.2 ± 2.8 mg.g⁻¹ of support and immobilization yield of ≈83% was obtained. The influence of relevant factors such as biocatalyst concentration and reaction temperature on the ester production was investigated. A central composite rotatable design (CCRD) was also used to optimize the reaction. Maximum acid conversion percentage of ≈65% was achieved after 12 h of reaction at 40 °C using a biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ and LA:IA molar ratio of 1:1.5 in a methyl isobutyl ketone (MIBK) medium. The biocatalyst retained ≈30% of its initial activity after six consecutive esterification batches. This study represents a new strategy for the sustainable production of a valuable industrial ester (isoamyl levulinate) from biomass-based materials using an immobilized low-cost commercial lipase.

Keywords: Eversa[®] Transform 2.0, Lipase immobilization, Biomass-based materials, Levulinic acid alkyl ester, Optimization.

1. Introduction

In recent years, the depletion of fossil fuels, their price fluctuations in the international market and the growing concern in greenhouse gas emissions reduction has encouraged researchers to focus their efforts in the production of industrially important materials, fuels or chemicals from renewable materials [1, 2]. In this field, several renewable raw materials such as triacylglycerols (oils and fats), proteins, lignocellulosic materials and agro-industrial and/or food residues have been used as substitutes to fossil fuels in the production of valuable chemical compounds of great industrial interest [1, 3–5]. Lignocellulosic materials, which consist mainly of cellulose, hemicellulose and lignin, such as agricultural waste (corn straw/cob, sugarcane bagasse), herbaceous crops (grass), woody wastes, wastes paper and other wastes (municipal or industrial) are among the most promising renewable raw materials in the production of biofuels and chemicals [1, 6–9].

Levulinic acid (LA), or 4-oxopentanoic acid, and its derivatives such as levulinic acid alkyl esters (LAAEs), so-called levulinate esters, are among the most promising platform chemicals obtained from lignocellulosic materials [3, 5, 9, 10]. LAAEs are compounds of great importance for the chemical industry because they are widely used as additives in fuels (diesel and biodiesel), and food or cosmetic formulations due to their flavoring, emulsifying and stabilizing properties [3, 5, 10]. Moreover, LAAEs have also been used in bioplasticizers production by reaction with epoxidized unsaturated fatty acid esters [11]. These valuable esters have been preferentially produced using several routes such as: *(i)* transformation of pentose (xylose) or hexoses (D-fructose or D-glucose) and their derivative (hydroxymethylfurfural – HMF) using short-chain alcohols such as methanol or ethanol [12–14]; *(ii)* alcoholysis of furfuryl alcohol [15, 16]; and *(iii)* esterification of LA with several alcohols [14, 15, 17–19]. This latter method has been

the most used to produce a variety of LAAEs using several traditional chemical catalysts (homogeneous or heterogeneous catalysts). These reactions require high reaction temperatures (between 100°C and 200 °C) and a large excess of solvents or reactants (short-chain alcohols) to achieve high yields [14, 15, 17, 20–23]. Some of these studies have been conducted using homogeneous catalysts such as H₂SO₄ [21, 24], methanesulfonic acid [22], and iron(III) dimer complex [23], that can cause partial oxidation of strating materials, damage to industrial equipments because they are highly corrosive, difficult separation of the product of interest and the issue of the environmental problems with the discharge of wastewaters [24, 25]. Thus, LAAEs production via enzymatic catalysis using lipases can eliminate these disadvantages of the classical chemical processes. These processes occur under milder reaction conditions of temperature and pressure with high selectivity, which minimize the generation of byproducts and, thus, the volume of wastes generated in the stages of separation or purification of products [3].

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases E.C. 3.1.1.3) are versatile enzymes that catalyze the hydrolysis of several triacylglycerols (oils and fats) in the interface oil/water to produce glycerol, free fatty acids, mono- and diacylglycerols [26–28]. In organic media, these enzymes catalyze also the production of several industrial esters, including LAAEs, via esterification, transesterification and interesterification reactions [3, 28, 29]. The industrial application of lipases in their free forms (powder or soluble formulations) is not appropriate due to the formation of aggregates by adsorpting polar molecules produced in the reaction such as water and glycerol. In addition, their difficult recovery at end of the process and their low catalytic activity in organic media are the main practical problems for their use in industrial processes [30–32].

In order to overcome such limitations, lipases have been preferentially used in their immobilized forms – heterogeneous biocatalysts [3, 29, 32, 33]. Several protocols have been used in the preparation of immobilized lipases, including adsorption, covalent attachment, entrapment, encapsulation, and crosslinking [29, 30, 32, 34]. The most used immobilization protocol is the physical adsorption on hydrophobic supports – mechanism of interfacial activation [27–29, 31]. Lipases have a “lid” or “flap” structure consisting of one or more polypeptide chains that covers their catalytic sites from the reaction medium – closed conformation. In the presence of hydrophobic surfaces such as hydrophobic supports, oil droplets, surfactants or air bubbles, this “lid” undergo conformational changes, thus exposing their catalytic sites to the medium – “open conformation”. The interfacial activation of lipases on hydrophobic supports must be performed at low ionic strength to reduce lipase-lipase dimers formation (interaction of two lipase molecules in open conformation) and to shift the closed/open equilibrium towards open conformation [31, 35, 36]. This protocol has demonstrated to be an efficient process to improve the catalytic performance, stability and selectivity of lipases in the production of industrial esters [31, 36–38].

In this context, the aim of this study was the enzymatic production of a branched LAAE (isoamyl levulinate) using biomass-based platform chemicals as starting materials – levulinic acid (LA) and isoamyl alcohol (IA). This short-chain alcohol is the main constituent in the fusel oil (around of 70–90% mass composition) [39–41], a by-product obtained in industrial bioethanol production. The use of these starting materials is an important approach for making the production of industrial esters more sustainable and closer to the biorefinery concept. For such purpose, a heterogeneous biocatalyst was prepared via interfacial activation of Eversa[®] Transform 2.0, a low-cost commercial lipase formulation (US\$ 20 per Kg) from *Thermomyces lanuginosus* expressed in

Aspergillus oryzae [33, 42, 43], on mesoporous PSty-DVB beads. This heterogeneous biocatalyst was chosen to develop the present study due to its high catalytic activity and reusability in the production of industrial polyol esters with lubricant properties [36, 37]. The enzymatic production of esters, including LAAEs, has been broadly conducted in solvent systems in order to increase the catalytic activity of lipases, to improve the solubility of starting materials in the reaction mixture and to shift the chemical equilibrium towards synthetic direction (ester production) [3, 44–48]. In this study, the influence of several organic solvents on the ester production was firstly studied and compared with a solvent-free system. After selecting the most suitable organic solvent, a central composite rotatable design (CCRD) was proposed to examine the influence of biocatalyst concentration and reaction temperature on the reaction. As esterification is a reversible reaction, an excess of any starting material has been used to shift the chemical equilibrium towards ester production, thus preventing reverse reaction (ester hydrolysis). Thus, the influence of LA:IA molar ratio was also investigated. Finally, the effect of time reaction on the reaction was studied. Biocatalyst reusability tests after successive batch esterifications were conducted under optimal experimental conditions. The enzymatic production of isoamyl levulinate still is few reported in the literature [19]. To the best of our knowledge, this is the first study using Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on mesoporous PSty-DVB beads, an interesting option to produce industrial esters from renewable materials (levulinic acid and isoamyl alcohol).

Materials and methods

Materials

Eversa[®] Transform 2.0, a liquid lipase formulation with protein concentration of 33 mg.g⁻¹, was acquired from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). PSty-DVB beads

(Diaion[®] HP-20), a support with specific surface area of 500 m².g⁻¹, average pore size of 260 Å and average particle size of 250–850 µm, was purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). Levulinic acid and isoamyl alcohol were respectively purchased from Sigma-Aldrich and Synth[®] Ltd. (São Paulo, SP, Brazil). All other chemical reagents and organic solvents were of analytical grade acquired from Synth[®] Ltd., and Vetec[®] Química Ltd. (São Paulo, SP, Brazil).

Preparation of the heterogeneous biocatalyst via physical adsorption

10 g of PSty-DVB beads were initially soaked into 50 mL of hydrous ethanol solution at 70% (m.m⁻¹) by 8 h under static conditions at 25 °C to remove air bubbles inside pores of the support [49, 50]. After, the excess of ethanol solution was removed via filtration in a Buchner funnel under vacuum and washed with 100 mL distilled water. A lipase solution was prepared by adding 12 mL of commercial lipase solution to 178 mL of 5 mmol.L⁻¹ buffer sodium acetate solution pH 5.0 (that corresponds to an initial protein loading of 40 mg.g⁻¹ of support). The prepared solution was then added to a 250 mL closed glass bottle containing the wetted support and immersed in a thermostatic water bath shaker under continuous stirring (200 rpm) at 25 °C by 18 h of contact. The immobilization process was monitored by determining the disappeared protein concentration [51], and hydrolytic activity [49, 52], in the supernatant solution at equilibrium. Immobilization yield was calculated as the ratio between the units of hydrolytic activity immobilized on the support surface and initial activity [53]. Immobilized protein amount was determined according to previous reports [50, 52, 54, 55]. After, the prepared heterogeneous biocatalyst was recovered via filtration in a Buchner funnel under vacuum, washed with distilled water and stored at 4 °C for 48 h.

General procedure for the enzymatic production of isoamyl levulinate

The esterification reactions were conducted in 100 mL closed glass bottles containing 6 g of reaction mixture and appropriate amounts of homogeneous (soluble lipase) and heterogeneous (immobilized lipase) biocatalysts. The reaction mixtures were immersed in a thermostatic water bath orbital shaker under fixed mechanical stirring (240 rpm). Periodically, aliquots from the reaction mixture (100 μL) were withdrawn, diluted in 10 mL of hydrous ethanol solution at 70% (m.m⁻¹) and titrated with NaOH solution (40 mmol.L⁻¹) using phenolphthalein as indicator to calculate acid conversion percentage (Y), as shown in Eq. (1) [38, 50, 54–56]. The reactions were performed with two replications and the results are represented as mean \pm deviation.

$$Y (\%) = \left(\frac{LA_0 - LA_t}{LA_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

where LA_0 is the initial LA concentration (mol.L⁻¹), and LA_t is the residual LA concentration after a certain contact time t (mol.L⁻¹).

The productivity (P) was determined according to Eq. (2) [38]:

$$P \left(\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{IP}}^{-1} \right) = \frac{LA_0 \times Y \times V}{t \times m_{\text{IP}}} \quad (2)$$

where: LA_0 is the initial LA concentration ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), Y is the acid conversion percentage (%), V is the volume of reaction mixture ($\approx 7.8 \times 10^{-3}$ L), t is the reaction time (min), and m_{IP} is the immobilized protein amount in the reaction (mg).

Influence of organic solvents on the ester production

The influence of organic solvents such as iso-octane, heptane, methyl ethyl ketone (MEK), *tert*-butanol (*t*-ButOH), cyclohexanone (CYH), and methyl isobutyl ketone (MIBK) on the ester production was firstly examined. The reactions were conducted

using a stoichiometric LA:IA molar ratio (500 mmol.L^{-1} of each reactant) containing 0.6 g of heterogeneous biocatalyst (biocatalyst concentration of $10\% \text{ m.m}^{-1}$ of reaction mixture that corresponds to an immobilized protein amount of 19.8 mg) under continuous mechanical stirring (240 rpm) at $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and a contact time of 24 h. Ester production in a solvent-free system was also performed under the same experimental conditions.

Optimization by CCRD: Influence of biocatalyst concentration and reaction temperature on the ester production

A CCRD with two independent variables (biocatalyst concentration and reaction temperature) consisting of thirteen runs, with four factorial points, four axial points and five center points to determine the pure error, was used to optimize isoamyl levulinate production. The levels of each factor were based on preliminary runs and previous studies reported in the literature [37, 57, 58]. The reactions were performed in a random to avoid possible systematic errors under fixed stoichiometric LA:IA molar ratio (6 g of reaction mixture containing 500 mmol.L^{-1} of each reactant in a MIBK medium that corresponds to 5.23 g of solvent, 0.44 g of LA, and 0.33 g of IA), mechanical stirring (240 rpm), and reaction time (3 h). The factors evaluated and their levels were reaction temperature ($25\text{--}55 \text{ }^{\circ}\text{C}$), and biocatalyst concentration ($5\text{--}20\% \text{ m.m}^{-1}$). Acid conversion percentage and productivity were taken as the dependent variables (responses). The experimental results were analyzed at 95% confidence level using the software Protimiza Experimental Design (<https://experimental-design.protimiza.com.br>) to develop 3D surface plots/contour plots and quadratic polynomial equations, and to determine the correlation between response variables (acid conversion percentage or productivity) and independent variables and their interactions, as follows – Eq. (3).

$$\text{Response} = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n a_{ij} x_i x_j + e \quad (3)$$

where *Response* is the predicted acid conversion percentage (Y) or productivity (P); *n* is the number of independent variables (2), x_i and x_j are the coded independent variables; a_0 , a_i , a_{ii} , and a_{ij} are the regression coefficients of intercept, linear, quadratic, and interaction terms, respectively; *i* and *j* are the index numbers of each independent variable and *e* is the random error.

The statistical significance of the regression coefficients was determined by *t*-Student's *t*-test. The fitting quality of the quadratic polynomial equations was determined by the coefficient of determination (R^2), while analysis of variance (ANOVA) was used to evaluate the statistical significance of the proposed models. 3D surface plots/contour plots were used to establish the optimal conditions and validation of the proposed models by performing esterification reactions under such experimental conditions. The experimental data were compared with predicted values determined according to Eq. (3).

Influence of LA:IA molar ratio on the ester production

The influence of LA:IA molar ratio (1:1; 1:1,25; 1:1.5 and 1:2) on the reaction was evaluated under optimal experimental conditions (40 °C and 20% m.m⁻¹ of biocatalyst that corresponds to an immobilized protein amount of 39.6 mg). The reactions were performed at fixed initial LA concentration (500 mmol.L⁻¹ in a MIBK medium), continuous mechanical stirring (240 rpm) and contact time (3 h).

Influence of reaction time on the ester production

The effect of reaction time on the reaction was studied under optimal experimental conditions: 40 °C, biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ of reaction mixture, 240 rpm and LA:IA molar ratio of 1:1.5 using 500 mmol.L⁻¹ of LA acid in a MIBK medium. Under such conditions, this reaction system consisted of a mixture of 5.08 g of solvent, 0.44 g of LA, and 0.48 g of IA.

Biocatalyst reusability tests

Reusability tests were conducted after five consecutive esterification batches of 12 h each under optimal conditions (40 °C, biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ of reaction mixture, 240 rpm and LA:IA molar ratio of 1:1.5 using 500 mmol.L⁻¹ of LA acid in a MIBK medium). At the end of each reaction, the prepared heterogeneous biocatalyst was recovered via filtration in a Buchner funnel under vacuum, washed with cold hexane in order to remove any starting materials or products retained in its microenvironment and re-suspended in a freshly reaction mixture to start new reactions. Acid conversion percentage was estimated at the end of each batch.

Results and discussion

In this study, a heterogeneous biocatalyst was prepared via interfacial activation of Eversa[®] Transform 2.0 on mesoporous PSty-DVB beads. A maximum immobilized protein concentration around of 31.2 ± 2.8 mg.g⁻¹ of support and an immobilization yield of ≈83% were obtained under fixed experimental conditions (5 mmol.L⁻¹ buffer sodium acetate pH 5.0 at 25 °C and 18 h of contact time using an initial protein loading of 40 mg.g⁻¹ of support). These results show clearly the high affinity of this enzyme for hydrophobic surfaces under such moderate conditions. Moreover, this support has a high average surface area and large pore size to immobilize a high protein amount in both

external and internal surfaces [50, 56], as aforementioned in Introduction Section. Its catalytic performance was evaluated in the production of isoamyl levulinate by esterification (Fig. 1). The influence of a series of factors on the reaction was evaluated in order to maximize the ester production, as follows:

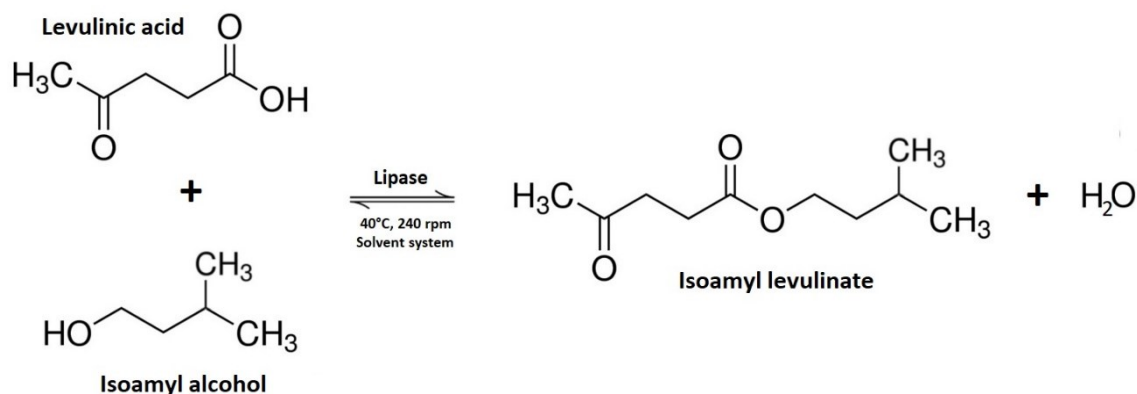


Figure 1. Representative scheme of enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification.

Influence of organic solvent on the ester production

Esterification reaction of LA and IA in a solvent-free system was initially proposed as a safety and sustainable process [60]. However, a maximum acid conversion percentage only of 7% was observed after 24 h of reaction (See Fig. 2). This result could be due to possible strong diffusional effects (substrate and/or pH gradients) [61–63], or essential water layer removal of the 3D structure of the enzyme that resulted in its partial inactivation [56, 64]. Thus, esterification reactions in solvent systems (non-polar and polar solvents) were performed in order to minimize such problems. Next, preliminary tests using two non-polar solvents widely used as reaction media in the enzymatic production of industrial esters [50, 65–67], such as heptane and iso-octane were investigated. However, LA has not been solubilized under such conditions due to its high polarity (formation of biphasic systems). Thus, ester production using polar organic

solvents such as methyl ethyl ketone (MEK), *tert*-butanol (*t*-ButOH), cyclohexanone (CYH), and methyl isobutyl ketone (MIBK) was performed. Under all these conditions, homogeneous phase formation was observed after 15 min of immersion in a temperature range varying from 25 to 60 °C. The influence of these polar solvents as reaction medium on the ester production is also shown in Fig. 2. A gradual increase in acid conversion percentage by increasing the contact time from 2 h to 24 h can be observed for all reaction systems, with exception of the reaction system using CYH as solvent that exhibited the highest maximum acid conversion of $\approx 40\%$ at 16 h. At 24 h of reaction, maximum acid conversion percentage was achieved in a MIBK medium ($52.8 \pm 3.0\%$), followed by CYH ($40.3 \pm 0.3\%$), MEK ($31.3 \pm 0.3\%$), and *t*-ButOH ($27.0 \pm 0.5\%$). These results show that the use of polar organic solvents is a crucial requirement for the production isoamyl levulinate using the prepared heterogeneous biocatalyst. These organic solvents can prevent the formation of an aqueous phase (adsorption of water molecules formed in the reaction) on the biocatalyst surface that inactive or inhibit its catalytic performance [3, 67]. In fact, the enzymatic production of several LAAEs via esterification has been extensively performed in solvent systems using methyl *tert*-butyl ether (MTBE), the most used organic solvent as reaction medium for such purpose [19, 44, 46, 64, 68], cyclohexane [47], diisopropyl ether [48], and ionic liquids [18], which are in agreement with the present study. Thus, MIBK was chosen as polar solvent to perform further tests.

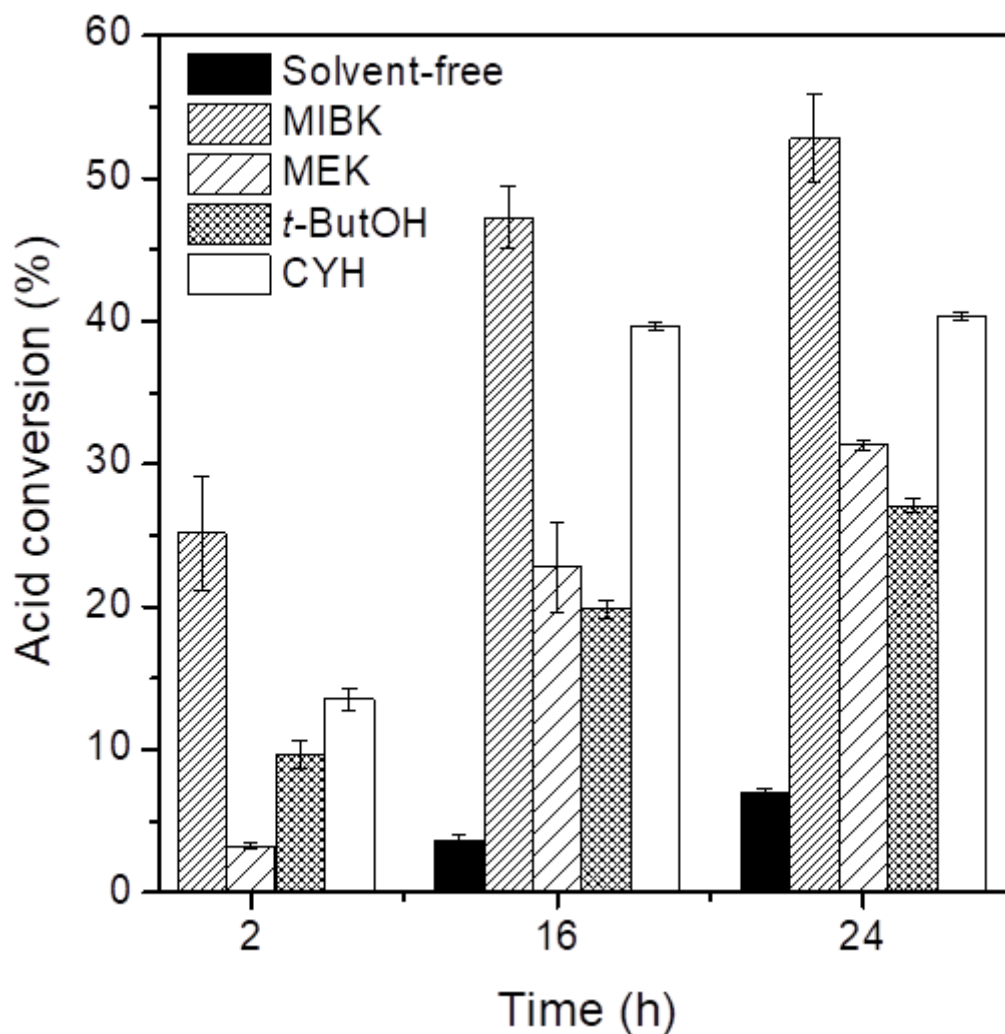


Figure 2. Influence of organic solvents on the enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification conducted using a stoichiometric LA:IA molar ratio (500 mmol.L^{-1} of each reactant), biocatalyst concentration of $10\% \text{ m.m}^{-1}$ of reaction mixture, mechanical stirring of 240 rpm and $40 \text{ }^\circ\text{C}$. MIBK – methyl isobutyl ketone; MEK – methyl ethyl ketone; *t*-ButOH – *tert*-butanol; and CYH – cyclohexanone.

Optimizing ester production using a CCRD approach

The influence of biocatalyst concentration ($5\text{--}20\% \text{ m.m}^{-1}$) and reaction temperature ($25\text{--}55 \text{ }^\circ\text{C}$) on the acid conversion percentage (Y) and productivity (P) is shown in Table 1. As can be observed, acid conversion percentage values varied from $24.3 \pm 0.7\%$ (Run #1) to 53.1 ± 4.7 (Run #6), while average productivity values varied

from $0.25 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{IP}}^{-1}$ (Run #2) to $0.60 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{IP}}^{-1}$ (Run #5) after 3 h of reaction. A good correlation between experimental and predicted values indicates that the proposed empirical models can be used for describing the influence of the independent variables (biocatalyst concentration and reaction temperature) on both responses. These experimental data were then used to estimate the main effects and their interactions on both dependent variables (responses), as shown in Table 2. The statistical analysis revealed that mean and linear effects of biocatalyst concentration (x_1) and reaction temperature (x_2) were significant at 95% of confidence level. On the other hand, the significant terms for productivity were mean, linear/quadratic terms of biocatalyst concentration (x_1 and x_1^2), linear term of reaction temperature (x_2) and the interaction between both variables ($x_1\cdot x_2$). These parameters had p -values below 0.05, as shown in Table 2. The regression coefficients for the significant parameters summarized in Table 2 were used to show their effects on both responses, expressed in terms of coded values, as shown in Eq. (5) and Eq. (6) for acid conversion percentage (Y) and productivity (P), respectively.

$$Y(\%) = 34.95 + 14.98x_1 + 9.49x_2 \quad (5)$$

$$P(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{IP}}^{-1}) = 0.30 - 0.21x_1 + 0.12x_1^2 + 0.10x_2 - 0.07x_1x_2 \quad (6)$$

where: Y is the acid conversion percentage; P is the productivity, and x_1 and x_2 represent the coded values for biocatalyst concentration and reaction temperature, respectively.

Table 1. CCRD matrix for the analysis of the effect of independent variables on the enzymatic production of isoamyl levulinate in terms of acid conversion and productivity. The reactions were performed under fixed mechanical stirring (240 rpm), stoichiometric LA:IA molar ratio (500 mmol.L⁻¹ of each reactant in a MIBK medium) and contact time (3 h).

Runs	Independent variables		Acid conversion		Productivity	
	Coded (actual)		(%)		$(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{IP}}^{-1})$	
	Biocatalyst (% m.m ⁻¹)	Temperature (°C)	Experimental	Predicted ^a	Experimental	Predicted ^b
1	-1 (7.2)	-1 (29.4)	24.3 ± 0.7	23.5	0.37	0.39
2	+1 (17.8)	-1 (29.4)	40.2 ± 0.4	42.3	0.25	0.26
3	-1 (7.2)	+1 (50.6)	35.3 ± 4.6	36.8	0.54	0.57
4	+1 (17.8)	+1 (50.6)	43.5 ± 3.0	47.9	0.27	0.28
5	-1.41 (5)	0 (40)	27.8 ± 0.7	28.1	0.60	0.58
6	+1.41 (20)	0 (40)	53.1 ± 4.7	49.2	0.29	0.28
7	0 (12.5)	-1.41 (25)	30.1 ± 0.4	29.9	0.26	0.25
8	0 (12.5)	+1.41 (55)	46.8 ± 0.6	43.3	0.41	0.39
9	0 (12.5)	0 (40)	35.7 ± 0.5	34.9	0.31	0.30
10	0 (12.5)	0 (40)	34.7 ± 1.4	34.9	0.30	0.30
11	0 (12.5)	0 (40)	35.3 ± 1.4	34.9	0.31	0.30
12	0 (12.5)	0 (40)	34.8 ± 0.3	34.9	0.30	0.30
13	0 (12.5)	0 (40)	34.2 ± 2.3	34.9	0.30	0.30

^a values calculated according to Eq. (5).

^b values calculated according to Eq. (6).

Table 2. Regression coefficients, standard errors and *p*-values for the proposed models (acid conversion percentage and productivity) of enzymatic ester production.

Acid conversion percentage			
Parameters	Regression coefficients	Standard errors	<i>p</i> -values
Mean	34.9486	± 1.2665	0.000000
x ₁	7.4939	± 1.0027	0.000140
x ₂	4.7449	± 1.0027	0.002127
Productivity			
Parameters	Regression coefficients	Standard errors	<i>p</i> -values
Mean	0.3040	± 0.0087	0.000000
x ₁	-0.1036	± 0.0069	0.000001
x ₁ ²	0.0625	± 0.0074	0.000065
x ₂	0.0503	± 0.0069	0.000164
x ₁ .x ₂	-0.0375	± 0.0097	0.006311

x₁ and x₂ represent the independent variables biocatalyst concentration and reaction temperature, respectively.

The analysis of variance (ANOVA) in Table 3 shows that the proposed models are adequate representation of the relationship between response and significant variables, with satisfactory coefficient of determination (R^2) of 92.34% and 98.17% for acid conversion percentage (Eq. (5)) and productivity (Eq. (6)), respectively. The pure errors were also very low (1.33 for acid conversion percentage and 0 for productivity as responses), thus indicating good reproducibility of the obtained experimental data. The

Fisher F -test also showed high significance for the regression models because the computed F -values for acid conversion percentage (16.90) and productivity (75.20) were higher than that the tabulated F -value at 5% level ($F_{0.05;5;7} = 3.97$). These results clearly show that the proposed models for the enzymatic ester production given by the Eq. (5) and (6) can be used to predict, create and explore the 3D surface plots/contour plots to determine the experimental conditions that optimize the reaction.

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) for the proposed models (acid conversion percentage and productivity) of enzymatic ester production.

Acid conversion percentage			
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	F-test
Regression	669.12	5	16.90
Residual	55.51	7	
<i>Lack of fit</i>	54.18	3	
<i>Pure error</i>	1.33	4	
Total	724.63	12	
$R^2 = 92.34\%$; $F_{0.05;5;7} = 3.97$			
Productivity			
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	F-test
Regression	0.10	5	75.20
Residual	0	7	
<i>Lack of fit</i>	0	3	
<i>Pure error</i>	0	4	
Total	0.10	12	
$R^2 = 98.17\%$; $F_{0.05;5;7} = 3.97$			

3D surface plots/contour plots of the combinations between biocatalyst concentration and reaction temperature are shown in Fig. 3A and 3B for acid conversion percentage and productivity, respectively. An increase in reaction temperature improves the solubility of starting materials and reduces the viscosity of the reaction system, thus increasing the mass transfer to the biocatalyst microenvironment [3, 60]. In fact, a gradual increase of acid conversion percentage values by raising the reaction temperature from 25 °C (lowest level – coded value of -1.41) to 55 °C (highest level – coded value of +1.41) can be observed (see Fig. 3A). Maximum acid conversion percentage can be achieved for esterification reactions conducted between 45.3 °C (coded value of +0.5) and 55 °C (coded value of +1.41). As the biocatalyst concentration was raised from 5% m.m⁻¹ (lowest level – coded value of -1.41) to 20% m.m⁻¹ (highest level – coded value of +1.41), the ester production expressed in terms of acid conversion percentage was also increased. 3D surface plots/contour plots analysis shows that maximum acid conversion percentage can be obtained using a biocatalyst concentration varying from 18.9% m.m⁻¹ (coded value of +1.25) to 20% m.m⁻¹ (coded value of +1.41). These results are due to a larger amount of active sites in the reaction system to catalyze the ester production [3]. Although both parameters have demonstrated positive and significant influence on the response, their interaction was not significant at 95% confidence level.

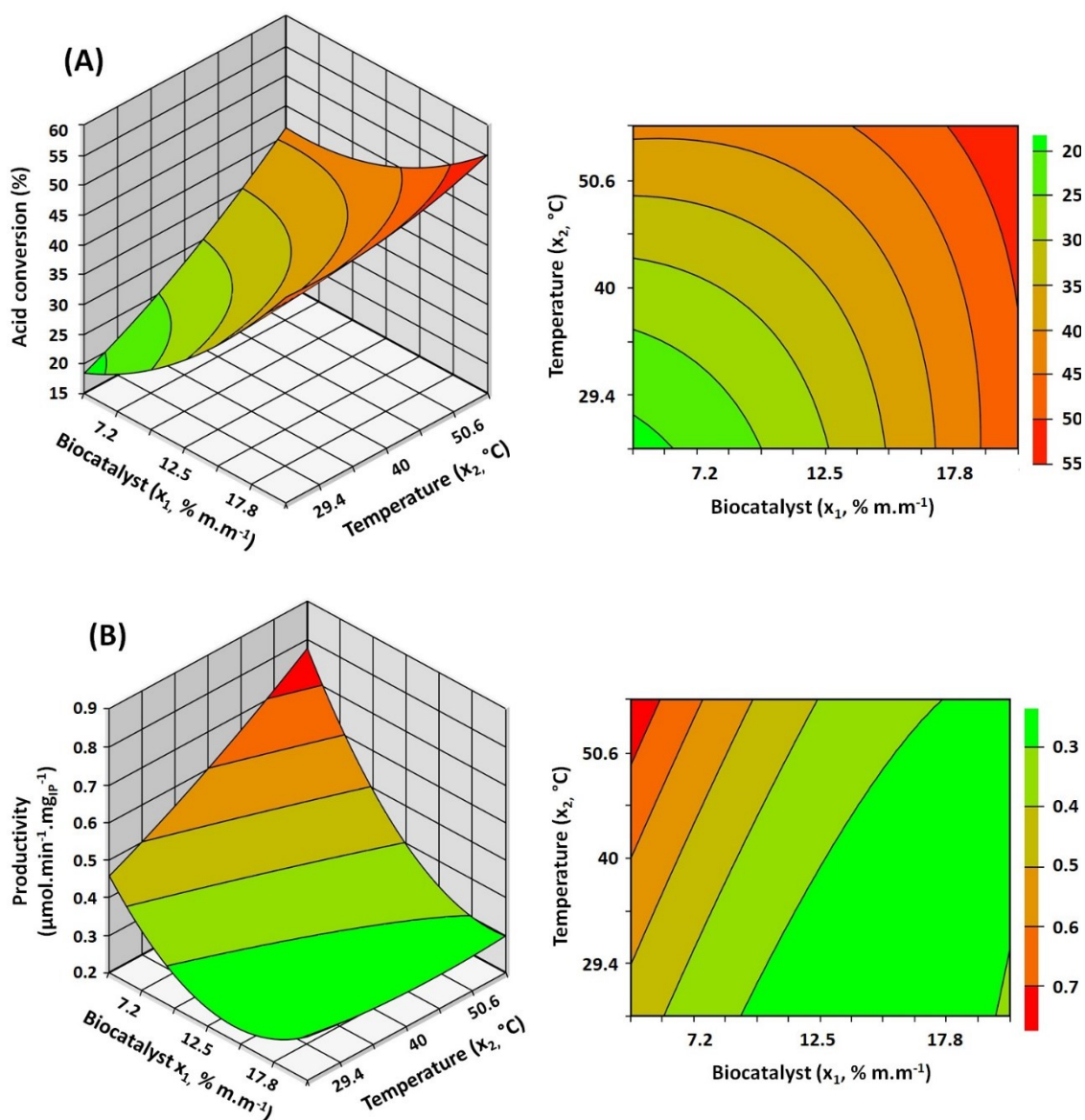


Figure 3. 3D surface plots/contour plots for the enzymatic production of isoamyl levulinate. Effect of reaction temperature and biocatalyst concentration on the acid conversion percentage (A) and productivity (B).

An increase in productivity values by increasing the reaction temperature can also be observed (Fig. 3B), as expected. On the other hand, high concentrations of heterogeneous biocatalyst resulted in a drastic reduction of the productivity. In fact, the increase of biocatalyst concentration by a four-fold factor, from 5% m.m⁻¹ (Run #5 in Table 1) to 20% m.m⁻¹ (Run #6 in Table 1), reduced twice the productivity value from

0.6 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{IP}}^{-1}$ to 0.29 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}_{\text{IP}}^{-1}$ at a fixed reaction temperature (40 °C). This suggests a possible adsorption of water molecules produced in the reaction on the biocatalyst surface that can lead to formation of a hydrophilic layer, thus reducing its catalytic performance [37, 69, 70]. The interaction between these two independent variables displayed a negative and significant at 95% confidence level – see Eq. (6). This indicates that increasing the reaction temperature and biocatalyst amounts can result in an increased capture of water molecules on its surface, as aforementioned.

The main interest of the present study is to maximize the ester production, thus further tests were then performed in order to achieve maximum acid conversion percentage. According to Fig. 3A and 3B, maximum acid conversion percentage can be achieved at highest levels of biocatalyst concentration (between 18.9% $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ and 20% $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$) and temperature (from 45.3 °C to 55 °C). Thus, a series of three runs were performed under such conditions and compared with the experimental condition that gave the maximum acid conversion percentage value in Table 1 (Run #6). The reaction conditions and corresponding experimental results (in terms of acid conversion and productivity) for each run are shown in Table 4. It is possible to observe that the experimental data were similar to predicted values only for productivity as response. On the other hand, low correlations between predicted and experimental values of acid conversion percentage were obtained. The results showed a decrease in acid conversion percentage values by increasing the reaction temperature from 40 °C ($46.7 \pm 2.7\%$ – Run #4) to 55 °C ($32.9 \pm 3.4\%$ – Run #1) using optimal biocatalyst concentration (coded values between +1.25 and +1.41 that corresponds respectively to 18.9% $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ and 20% $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$). In this case, an increased capture of water molecules generated in the reaction by using high biocatalyst amounts in the reaction system could shift the chemical equilibrium towards reverse reaction (ester hydrolysis). Moreover, the hydrolytic activity of the

prepared heterogeneous biocatalyst can be improved, with concomitant decrease of its esterification activity, by increasing the reaction temperature that drastically reduces ester yields [18]. This strong influence of reaction temperature on the hydrolytic and esterification activities of an immobilized lipase was observed in a previous study with a drastic decrease of its esterification activity on the methyl levulinate production above 40 °C [18]. Thus, further tests were conducted at 40 °C using 20% m.m⁻¹ of biocatalyst in a MIBK medium.

Table 4. Ester production under optimal conditions determined by analysis of 3D surface plots/contour plots.

Runs	Independent variables		Acid conversion		Productivity	
	Coded (actual)		(%)		($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgIP}^{-1}$)	
	Biocatalyst (% m.m ⁻¹)	Temperature (°C)	Experimental	Predicted ^a	Experimental	Predicted ^b
1	+1.41 (20)	+1.41 (55)	32.9 ± 3.4	69.4	0.18	0.24
2	+1.25 (18.9)	+1 (50.6)	37.7 ± 2.5	63.2	0.22	0.23
3	+1.41 (20)	+0.5 (45.3)	40.9 ± 3.8	60.8	0.22	0.24
4	+1.41 (20)	0 (40)	46.7 ± 2.7	49.2	0.29	0.28

* Experimental conditions reported for run #6 in Table 1.

^a values calculated according to Eq. (5).

^b values calculated according to Eq. (6).

Influence of LA:IA molar ratio on the ester production

The influence of LA:IA molar ratio varying from 1:1 to 1:2 on the ester production after 4 h of reaction was investigated (Fig. 4). As expected, a slight excess of isoamyl alcohol in the reaction system increased the ester production and maximum acid conversion percentage of $\approx 51\%$ was observed using a molar ratio LA:IA of 1:1.5. Similar acid conversion percentage was obtained at the highest LA:IA molar ratio tested in this study (1:2). The enzymatic production of several LAAEs via esterification reaction has also been improved using excess of alcohol in the reaction mixtures [3]. Thus, a LA:IA molar ratio of 1:1.5 was selected for further tests.

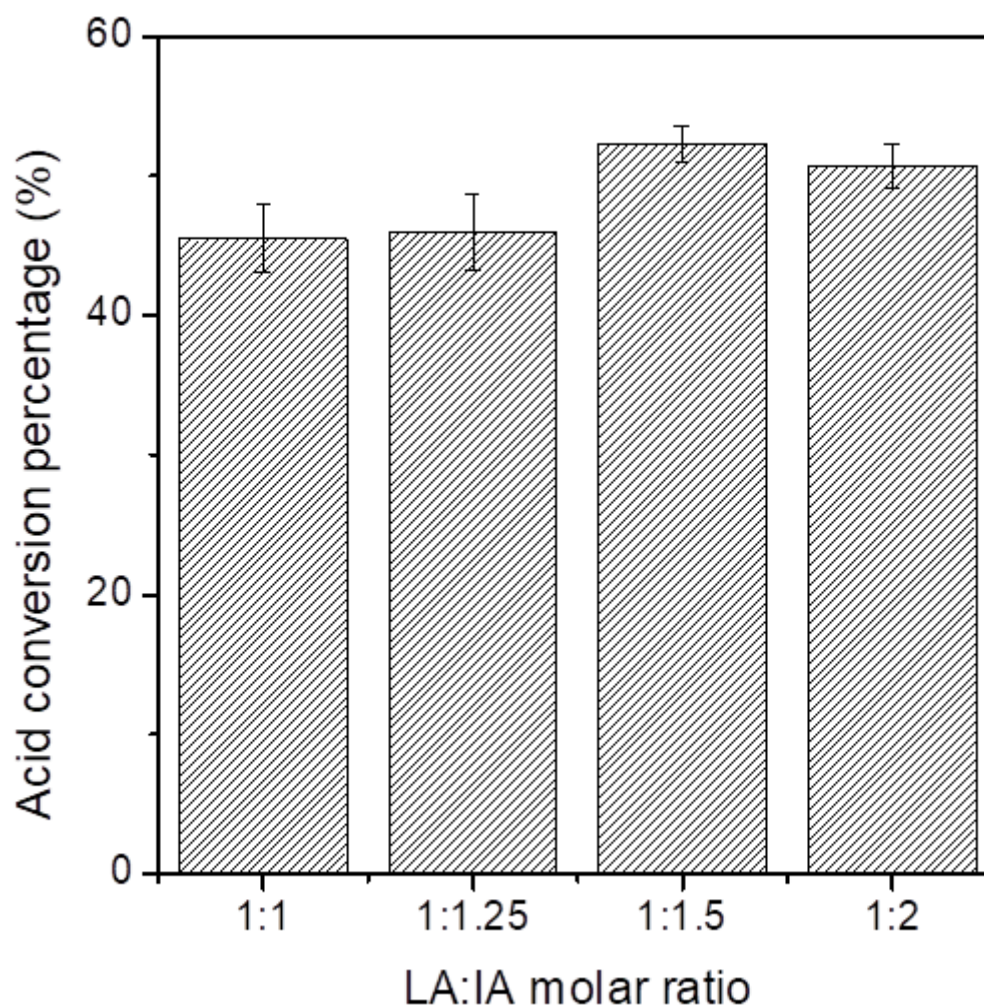


Figure 4. Influence of LA:IA molar ratio on the enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification. The reactions were performed at fixed LA concentration (500 mmol.L^{-1} in a MIBK medium), biocatalyst concentration of $20\% \text{ m.m}^{-1}$ of reaction mixture, mechanical stirring of 240 rpm, 40°C and reaction time of 3 h.

Influence of reaction time on the ester production

The influence of reaction time on the reaction was assessed under optimal conditions: 40°C , 240 rpm, biocatalyst concentration of $20\% \text{ m.m}^{-1}$, LA:IA molar ratio of 1:1.5 using fixed LA concentration (500 mmol.L^{-1}) in a MIBK medium. In this set of experiments, liquid lipase preparation was not used as biocatalyst due to its low catalytic activity in organic media [36–38]. According to Fig. 5, maximum acid conversion

percentage around of 66% was achieved after 12 h of reaction that corresponds to a productivity of $\approx 0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mgIP}^{-1}$. This result indicates that the prepared biocatalyst required a shorter reaction time under milder experimental conditions (lower excess of starting materials and reaction temperature) compared to other previous studies reported in the literature for the production of several LAAEs using several heterogeneous catalysts (traditional chemical or biochemical catalysts), as shown in Table 5. Thus, biocatalyst reusability tests were assessed after successive cycles of esterification reaction of 12 h each.

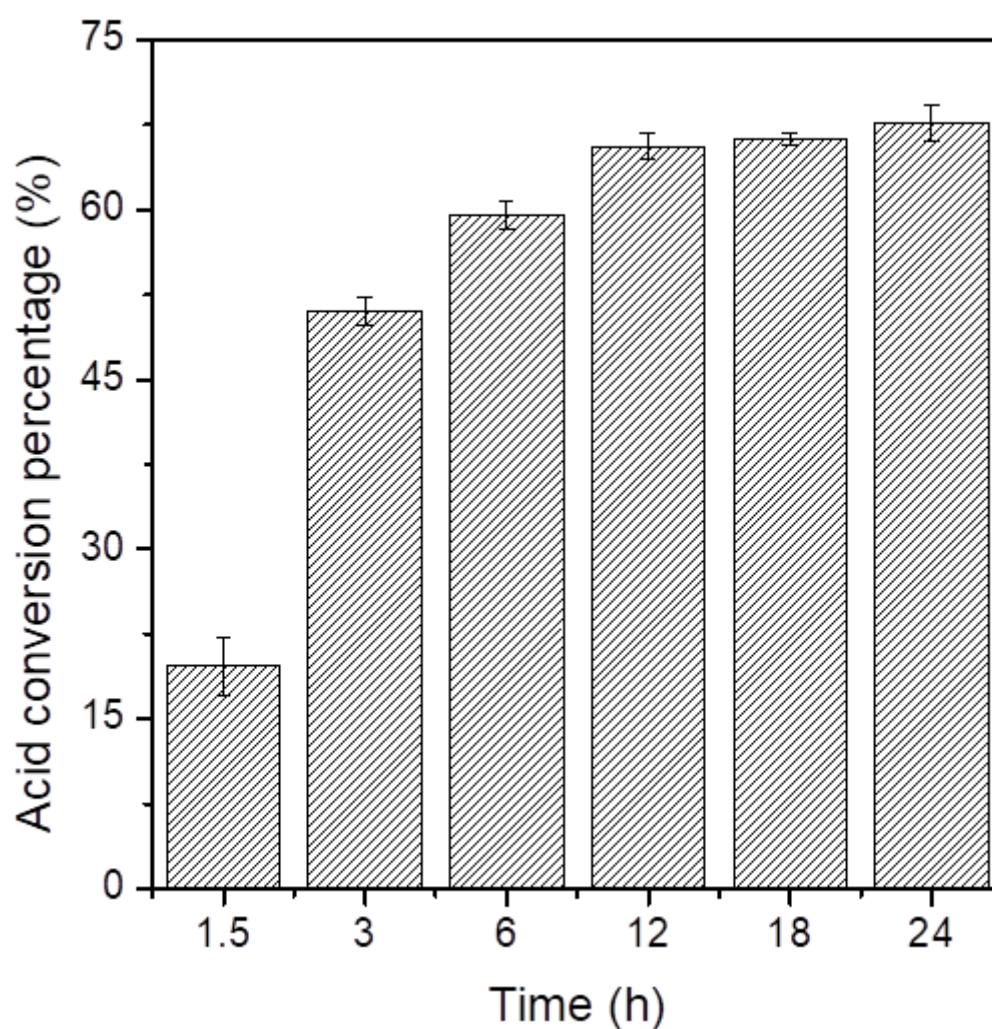


Figure 5. Effect of reaction time on the enzymatic production of isoamyl levulinate via esterification. The reactions were performed at fixed LA concentration ($500 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ in

a MIBK medium), mechanical stirring of 240 rpm, 40 °C and protein amount of 39.6 mg that corresponds to 1.2 g of heterogeneous biocatalyst (20% m.m⁻¹).

Table 5. Literature survey for LAAEs production using several heterogeneous catalysts in batch reactors.

Alcohol	Catalyst	Experimental conditions	Yield/Conversion (%)	Reaction time (h)	Reuse (residual activity - %)	Reference
<i>n</i> -Butanol, <i>n</i> -octanol and <i>n</i> -lauryl alcohol	CALB ^a immobilized on an organosilica material (3DOM/m-OS)	Esterification of LA with alcohols in solvent-free systems – LA:alcohol molar ratio of 1:10, 40 °C and 10 mg of biocatalyst.	74.59 for <i>n</i> -butanol, 84.51 for <i>n</i> -octanol and 91.14 for <i>n</i> -lauryl alcohol	12	9 (46.18) for <i>n</i> -butanol, 9 (82.33) for <i>n</i> -octanol and 9 (81.25) for <i>n</i> -lauryl alcohol	[73]
Methanol	Immobilized CALB ^a on Lewatit VP OC 1600 (Novozym 435)	Esterification of LA with methanol at a molar ratio of 1:5 in a [BMIM][PF6] ^b medium, 30 °C and 10 mg.mL ⁻¹ of biocatalyst.	93	24	5 (43.2)	[18]
<i>n</i> -Lauryl alcohol	CALB ^a immobilized on hydrophobic virus-like organosilica nanoparticles	Esterification of LA with <i>n</i> -lauryl alcohol in a solvent-free system – LA:alcohol molar ratio of 1:11.5, and 51.2 °C.	84.84	22.6	9 (75.7)	[74]
Ethanol, <i>n</i> -Butanol, and <i>n</i> -lauryl alcohol	Lipase from <i>Alkalispirillum</i> sp. immobilized on Florisil [®] functionalized with glutaraldehyde.	Esterification in solvent-free systems using LA:alcohol molar ratio of 1:10, 20 mg of biocatalyst and 55 °C.	48.8 for ethanol, 45.9 for <i>n</i> -butanol, and 26.2 for <i>n</i> -lauryl alcohol	12	9 (69) for ethanol, 9 (57) for <i>n</i> -butanol, and 9 (18.5) for <i>n</i> -lauryl alcohol	[75]
Methanol	Immobilized CALB ^a on Lewatit VP OC 1600 (Novozym 435)	Esterification using [BMIM][PF6] ^b as solvent – LA:methanol molar ratio of 1:3, 10 g.L ⁻¹ of biocatalyst, 30 °C.	≈92	24	NP ^c	[76]

Table 5. Continuation.

Alcohol	Catalyst	Experimental conditions	Yield/Conversion (%)	Reaction time (h)	Reuse (residual activity - %)	Reference
Ethanol	A. Sulfated Si-doped ZrO ₂ materials	Esterification using 10% m.m ⁻¹ of catalyst, LA:alcohol molar ratio of 1:10, 70 °C and 700 rpm.	77.5	10	5 (20%)	[77]
Ethanol	B. Amberlyst-15	Esterification using a biocatalyst concentration of 22 Kg.m ⁻³ , LA:alcohol molar ratio of 1:5, 90 °C and 600 rpm.	91	24	NP ^c	[78]
Ethanol	Hierarchical ZSM-12 nanosized crystals	Esterification at 100 °C, stoichiometric LA:ethanol molar ratio (1:1) and 0.3 g of catalyst.	12.0 – 56.3	24	NP ^c	[79]
Isoamyl alcohol	Immobilized Eversa Transform 2.0 on PSty-DVB	Esterification of LA with IA in a MIBK medium using a LA:IA molar ratio of 1:1.5 (500 mmol.L ⁻¹ of LA), 40 °C, 20% m.m ⁻¹ of biocatalyst and 240 rpm.	≈65	12	5 (≈30)	This study

a: lipase B from *Candida antarctica*;

b: butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate;

c: not performed;

Reusability studies

The reusability of immobilized enzymes is a crucial factor because of its economic importance in industrial process. For this reason, the reusability of the prepared heterogeneous biocatalyst under optimal experimental conditions after six consecutive batches of 12 h each in a MIBK medium was investigated. According to Fig. 6, a gradual decrease of the original activity of the enzyme after successive cycles of reaction was observed. After five repeated batch esterification reactions, the prepared biocatalyst retained $\approx 30\%$ of its initial activity (acid conversion percentage around of 18% at 5th batch). This decrease could be due to possible accumulation of residual starting materials and/or products retained in the biocatalyst microenvironment that can promote desorption of some lipase molecules or distortion/inhibitory effects on the 3D-structure of the enzyme [38, 71]. These results suggest further studies in order to improve the reusability of Eversa[®] Transform 2.0 via stabilization by covalent attachment on pre-existing activated supports that can reduce possible enzyme desorption effects [29, 33, 34].

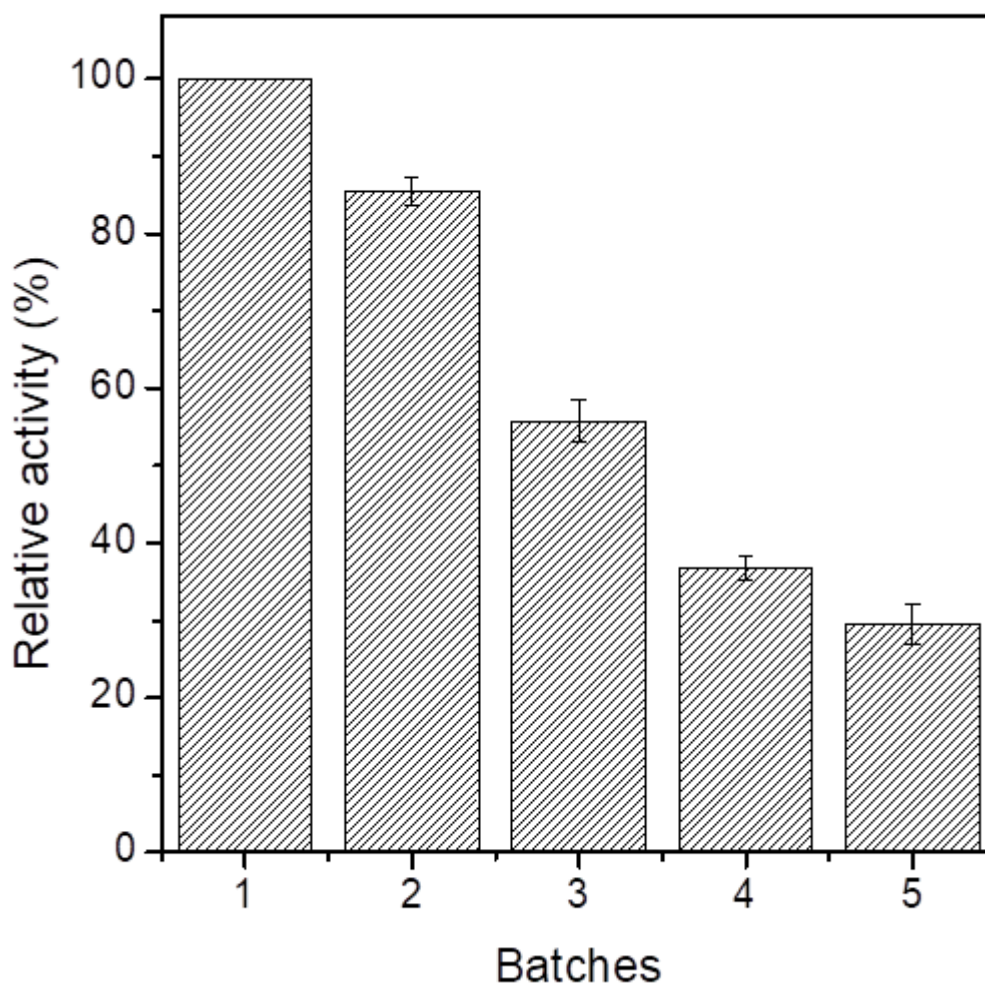


Figure 6. Reusability tests for successive esterification batches performed using a LA:IA molar ratio of 1:1.5 at fixed LA concentration (500 mmol.L^{-1} in a MIBK medium), biocatalyst concentration of $20\% \text{ m.m}^{-1}$ of reaction mixture, mechanical stirring of 240 rpm and $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Relative activity of 100% corresponds to an acid conversion percentage of $\approx 65\%$.

Conclusion

The present study demonstrated that a simple and highly effective protocol of immobilization via physical adsorption of Eversa[®] Transform 2.0 on PSty-DVB can be a promising strategy for the sustainable production of a valuable LAE (isoamyl levulinate) via esterification under moderate conditions. The results obtained in this study clearly showed that the use of a polar solvent (MIBK) as reaction medium can prevent the formation of a

hydrophilic layer on the biocatalyst surface that minimizes possible reversible reaction (ester hydrolysis) and distortion/inactivation of the enzyme. Under moderate conditions, a maximum acid conversion percentage around of 65% was achieved after 12 h of reaction. The prepared biocatalyst can be easily recovered via filtration and reused after consecutive esterification in a batch mode. This study provides new opportunities for the industrial use of an immobilized low-cost lipase (Eversa[®] Transform 2.0) to catalyze the production of a high value-added ester from biomass-based platform chemicals. Moreover, further studies will be performed using fusel oil as a starting material and covalent attachment of the lipase on pre-existing supports, including activated lignocellulosic-based materials, to improve its stabilization after repeated batches. This could consolidate the biomass-based materials use in an integrated process, constituting a Biorefinery.

References

1. Ramos MDN, Milessi TS, Candido RG, *et al*(2022) Enzymatic catalysis as a tool in biofuels production in Brazil: current status and perspectives. *Energy Sustain Dev* 68:103–119. <https://doi.org/10.1016/J.ESD.2022.03.007>
2. Saravanan A, Senthil Kumar P, Jeevanantham S, *et al*(2022) Recent advances and sustainable development of biofuels production from lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol* 344:126203. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.126203>
3. Badgujar KC, Badgujar VC, Bhanage BM (2022) Lipase as a green and sustainable material for production of levulinate compounds: State of the art. *Mater Sci Energy Technol* 5:232–242. <https://doi.org/10.1016/J.MSET.2022.02.005>
4. Khemthong P, Yimsukanan C, Narkkun T, *et al*(2021) Advances in catalytic production of value-added biochemicals and biofuels via furfural platform derived lignocellulosic biomass. *Biomass Bioenergy* 148:106033.

- <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2021.106033>
5. Tian Y, Zhang F, Wang J, *et al*(2021) A review on solid acid catalysis for sustainable production of levulinic acid and levulinate esters from biomass derivatives. *Bioresour Technol* 342:125977. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125977>
 6. Williams CL, Westover TL, Emerson RM, *et al*(2016) Sources of biomass feedstock variability and the potential impact on biofuels production. *BioEnergy Res* 9:1–14. <https://doi.org/10.1007/s12155-015-9694-y>
 7. Schuster BG, Chinn MS (2013) Consolidated bioprocessing of lignocellulosic feedstocks for ethanol fuel production. *BioEnergy Res* 6:416–435. <https://doi.org/10.1007/s12155-012-9278-z>
 8. Nahak BK, Preetam S, Sharma D, *et al*(2022) Advancements in net-zero pertinency of lignocellulosic biomass for climate neutral energy production. *Renew Sustain Energy Rev* 161:112393. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2022.112393>
 9. Aainaa N, Ramli S, Aishah N, Amin S (2020) Catalytic conversion of carbohydrate biomass in ionic liquids to 5-hydroxymethyl furfural and levulinic acid: a review. *BioEnergy Res* 13:693–736. <https://doi.org/10.1007/s12155-020-10125-8>
 10. Sajid M, Farooq U, Bary G, *et al*(2021) Sustainable production of levulinic acid and its derivatives for fuel additives and chemicals: progress, challenges, and prospects. *Green Chem* 23:9198–9238. <https://doi.org/10.1039/d1gc02919c>
 11. Selifonov S (2013) Adducts of levulinic derivatives with epoxidized fatty acid esters and uses thereof. United States Patent US 8,436,042 B2.
 12. Rackemann DW, Bartley JP, Doherty WOS (2014) Methanesulfonic acid-catalyzed conversion of glucose and xylose mixtures to levulinic acid and furfural. *Ind Crops Prod* 52:46–57. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2013.10.026>
 13. Quereshi S, Ahmad E, Pant KK, Dutta S (2017) Insights into the metal salt catalyzed

- ethyl levulinate synthesis from biorenewable feedstocks. *Catal Today* 291:187–194. <https://doi.org/10.1016/J.CATTOD.2016.12.019>
14. Song D, Sun Y, Zhang Q, *et al*(2017) Fabrication of propylsulfonic acid functionalized SiO₂ core/PMO shell structured PrSO₃H-SiO₂@Si(R)Si nanospheres for the effective conversion of d-fructose into ethyl levulinate. *Appl Catal A Gen* 546:36–46. <https://doi.org/10.1016/J.APCATA.2017.08.004>
 15. Song D, An S, Sun Y, Guo Y (2016) Efficient conversion of levulinic acid or furfuryl alcohol into alkyl levulinates catalyzed by heteropoly acid and ZrO₂ bifunctionalized organosilica nanotubes. *J Catal* 333:184–199. <https://doi.org/10.1016/J.JCAT.2015.10.018>
 16. Tiwari MS, Dicks JS, Keogh J, *et al*(2020) Direct conversion of furfuryl alcohol to butyl levulinate using tin exchanged tungstophosphoric acid catalysts. *Mol Catal* 488:110918. <https://doi.org/10.1016/J.MCAT.2020.110918>
 17. Morawala DH, Dalai AK, Kalpana CM (2020) Synthesis of n-butyl levulinate using mesoporous zeolite H-BEA catalysts with different catalytic characteristics. *Catal Lett* 3:1049–1060. <https://doi.org/10.1007/s10562-019-03005-0>
 18. Di X, Zhang Y, Fu J, *et al*(2019) Biocatalytic upgrading of levulinic acid to methyl levulinate in green solvents. *Process Biochem* 81:33–38. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2019.03.024>
 19. Salvi HM, Yadav GD (2019) Surface functionalization of SBA-15 for immobilization of lipase and its application in synthesis of alkyl levulinates: optimization and kinetics. *Biocatal Agric Biotechnol* 18:101038. <https://doi.org/10.1016/J.BCAB.2019.101038>
 20. Peixoto AF, Soliman MMA, Pinto T V., *et al*(2021) Highly active organosulfonic aryl-silica nanoparticles as efficient catalysts for biomass derived biodiesel and fuel additives. *Biomass Bioenergy* 145:105936. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2020.105936>

21. Zhao S, Wang Z, Chang C, *et al*(2021) Enhanced production of levulinic acid/ester from furfural residue via pretreatment and two-stage alcoholysis. *Biomass Convers Biorefin* <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01307-1>
22. Mthembu LD, Lokhat D, Deenadayalu N (2021) Esterification of levulinic acid to ethyl levulinate: optimization of process conditions using commercial levulinic acid and extension to the use of levulinic acid derived from depithed sugarcane bagasse. *Biomass Convers Biorefin* <https://doi.org/10.1007/s13399-021-01632-5>
23. Melchiorre M, Amendola R, Benessere V, *et al*(2020) Solvent-free transesterification of methyl levulinate and esterification of levulinic acid catalyzed by a homogeneous iron(III) dimer complex. *Mol Catal* 483:110777. <https://doi.org/10.1016/J.MCAT.2020.110777>
24. Zhai S, Zhang L, Zhao X, *et al*(2022) Enzymatic synthesis of a novel solid–liquid phase change energy storage material based on levulinic acid and 1,4-butanediol. *Bioresour Bioprocess* 9:12. <https://doi.org/10.1186/S40643-022-00502-W>
25. Akerman CO, Gaber Y, Ghani NA, *et al*(2011) Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. *J Mol Catal B Enzym* 72:263–269. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2011.06.014>
26. Verger R (1997) ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol* 15:32–38. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0)
27. Schmid RD, Verger R (1998) Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chemie Int Ed* 37:1608–1633. [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)
28. Fernandez-Lafuente R (2010) Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. *J Mol Catal B Enzym* 62:197–212. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2009.11.010>

29. Adlercreutz P (2013) Immobilisation and application of lipases in organic media. *Chem Soc Rev* 42:6406–6436. <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>
30. Bilal M, Iqbal HMN (2019) Naturally-derived biopolymers: Potential platforms for enzyme immobilization. *Int J Biol Macromol* 130:462–482. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2019.02.152>
31. Rodrigues RC, Virgen-Ortíz JJ, dos Santos JCS, *et al*(2019) Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol. Adv.* 37:746–770
32. Zhong L, Feng Y, Wang G, *et al*(2020) Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. *Int J Biol Macromol* 152:207–222. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2020.02.258>
33. Monteiro RRC, Arana-Peña S, da Rocha TN, *et al*(2021) Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renew Energy* 164:1566–1587. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2020.10.071>
34. Bolina ICA, Gomes RAB, Mendes AA (2021) Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: current scenario and future perspectives. *BioEnergy Res* 14:1039–1057. <https://doi.org/10.1007/S12155-020-10242-4>
35. Manoel EA, dos Santos JCS, Freire DMG, *et al*(2015) Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol* 71:53–57. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2015.02.001>
36. Carvalho WCA, Luiz JHH, Fernandez-Lafuente R, *et al*(2021) 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 catalyst. *Biomass Bioenergy* 155:106302. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2021.106302>
37. Guedes Júnior JGE, Mattos FR, Sabi GJ, *et al*(2022) Design of a sustainable process for

- enzymatic production of ethylene glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil. *J Environ Chem Eng* 10:107062. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2021.107062>
38. Sabi GJ, Gama RS, Fernandez-Lafuente R, *et al*(2022) Decyl esters production from soybean-based oils catalyzed by lipase immobilized on differently functionalized rice husk silica and their characterization as potential biolubricants. *Enzyme Microb Technol* 157:110019. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2022.110019>
39. Cerón AA, Vilas Boas RN, Biaggio FC, de Castro HF (2018) Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. *Biomass Bioenergy* 119:166–172. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2018.09.013>
40. Vilas Bôas RN, Lima R de, Mendes AA, *et al*(2021) Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: Lipase screening, reactor system development, and reaction optimization. *Chem Eng Process* 168:108568. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2021.108568>
41. Dias ALB, Ubeyitogullari A, Hatami T, *et al*(2021) Continuous production of isoamyl acetate from fusel oil under supercritical CO₂: A mass transfer approach. *Chem Eng Res Des* 176:23–33. <https://doi.org/10.1016/J.CHERD.2021.09.026>
42. Wancura JHC, Fantinel AL, Ugalde GA, *et al*(2021) Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations. *J Clean Prod* 285:124838. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.124838>
43. Coppini M, Magro JD, Martello R, *et al* Production of methyl esters by enzymatic hydroesterification of chicken fat industrial residue. *Braz J Chem Eng* 36:923–928. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180389>

44. Yadav GD, Borkar I V. (2008) Kinetic Modeling of immobilized lipase catalysis in synthesis of n-butyl levulinate. *Ind Eng Chem Res* 47:3358–3363. <https://doi.org/10.1021/IE800193F>
45. Badgujar KC, Bhanage BM (2015) Thermo-chemical energy assessment for production of energy-rich fuel additive compounds by using levulinic acid and immobilized lipase. *Fuel Process Technol* 138:139–146. <https://doi.org/10.1016/J.FUPROC.2015.05.015>
46. Bhavsar KV., Yadav GD (2018) n-Butyl levulinate synthesis using lipase catalysis: comparison of batch reactor versus continuous flow packed bed tubular microreactor. *J Flow Chem* 8:97–105. <https://doi.org/10.1007/S41981-018-0014-5>
47. Szelwicka A, Siewniak A, Kolanowska A, *et al*(2021) PTFE-carbon nanotubes and lipase B from *Candida antarctica* - long-lasting marriage for ultra-fast and fully selective synthesis of levulinate esters. *Mater* 14:1518. <https://doi.org/10.3390/MA14061518>
48. Kowalczykiewicz D, Szymańska K, Gillner D, Jarzębski AB (2021) Rotating bed reactor packed with heterofunctional structured silica-supported lipase. Developing an effective system for the organic solvent and aqueous phase reactions. *Microporous Mesoporous Mater* 312:110789. <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2020.110789>
49. Mendes AA, Oliveira PC, Vélez AM, *et al*(2012) Evaluation of immobilized lipases on poly-hydroxybutyrate beads to catalyze biodiesel synthesis. *Int J Biol Macromol* 50:503–511. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2012.01.020>
50. Alves MD, Aracri FM, Cren ÉC, Mendes AA (2017) Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chem Eng J* 311:1–12. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2016.11.069>
51. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

52. Bassi JJ, Todero LM, Lage FAP, *et al*(2016) Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. *Int J Biol Macromol* 92:900–909. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.097>
53. Boudrant J, Woodley JM, Fernandez-Lafuente R (2020) Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. *Process Biochem.* 90:66–80. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.11.026>
54. Lage FAP, Bassi JJ, Corradini MCC, *et al*(2016) 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* 84:56–67. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2015.12.007>
55. Machado NB, Miguez JP, Bolina ICA, *et al*(2019) Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption. *Enzyme Microb Technol* 128:9–21. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2019.05.001>
56. Alves MD, Cren ÉC, Mendes AA (2016) Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. *J Mol Catal B Enzym* 133:S377–S387. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2017.02.011>
57. Todero LM, Bassi JJ, Lage FA, *et al*(2015) Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. *Bioprocess Biosyst Eng* 38:. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1402-y>
58. Barbosa MS, Freire CCC, Brandão LMS, *et al*(2021) Biolubricant production under zero-waste *Moringa oleifera Lam* biorefinery approach for boosting circular economy. *Ind Crops Prod* 167:113542. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113542>
59. Van Aken K, Streckowski L, Patiny L, Streckowski - L (2006) EcoScale, a semi-quantitative tool to select an organic preparation based on economical and ecological

- parameters. *Beilstein J Org Chem* 2:. <https://doi.org/10.1186/1860-5397-2-3>
60. Sousa RR, Silva AS, Fernandez-Lafuente R, Ferreira-Leitão VS (2021) Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives. *Catal Sci Technol* 11:5696–5711. <https://doi.org/10.1039/D1CY00696G>
 61. Regan DL, Lilly MD, Dunnill P (1974) Influence of intraparticle diffusional limitation on the observed kinetics of immobilized enzymes and on catalyst design. *Biotechnol Bioeng* 16:1081–1093. <https://doi.org/10.1002/bit.260160808>
 62. Tischer W, Kasche V, Tischer W, *et al*(1999) Immobilized enzymes: crystals or carriers? *Trends Biotechnol* 17:326–335. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(99\)01322-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(99)01322-0)
 63. Shen L, Chen Z (2007) Critical review of the impact of tortuosity on diffusion. *Chem Eng Sci* 62:3748–3755. <https://doi.org/10.1016/j.ces.2007.03.041>
 64. Badgajar KC, Bhanage BM (2015) Immobilization of lipase on biocompatible copolymer of polyvinyl alcohol and chitosan for synthesis of laurate compounds in supercritical carbon dioxide using response surface methodology. *Process Biochem* 50:1224–1236. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.04.019>
 65. Miguez JP, Gama RS, Bolina ICA, *et al*(2018) Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. *Chem Eng Res Des* 139:296–308. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2018.09.037>
 66. Mendoza-Ortiz PA, Gama RS, Gómez OC, *et al*(2020) Sustainable enzymatic synthesis of a solketal ester - process optimization and evaluation of its antimicrobial activity. *Catalysts* 10:218. <https://doi.org/10.3390/catal10020218>
 67. Kumar A, Dhar K, Kanwar SS, Arora PK (2016) Lipase catalysis in organic solvents: Advantages and applications. *Biol Proced Online* 18:2. <https://doi.org/10.1186/S12575->

- 016-0033-2
68. Jia B, Liu C, Qi X (2020) Selective production of ethyl levulinate from levulinic acid by lipase-immobilized mesoporous silica nanoflowers composite. *Fuel Process Technol* 210:106578. <https://doi.org/10.1016/J.FUPROC.2020.106578>
 69. Páez BC, Medina AR, Rubio FC, *et al*(2003) Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. *Enzyme Microb Technol* 33:845–853. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00219-9)
 70. Kim H, Choi N, Kim Y, *et al*(2019) Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. *Renew Energy* 130:489–494. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.06.092>
 71. Virgen-Ortíz JJ, Tacias-Pascacio VG, Hirata DB, *et al*(2017) Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports. *Enzyme Microb Technol* 96:30–35. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2016.09.010>
 72. Esfandmaz S, Chaibakhsh N, Moradi-Shoeili Z, Mohammadi A (2018) Eco-friendly synthesis of maleate ester: A comparison between solid acid and enzyme-catalyzed esterification. *Sustain Chem Pharm* 8:82–87. <https://doi.org/10.1016/J.SCP.2018.03.003>
 73. Zhou L, He Y, Ma L, *et al*(2018) Conversion of levulinic acid into alkyl levulinates: Using lipase immobilized on meso-molding three-dimensional macroporous organosilica as catalyst. *Bioresour Technol* 247:568–575. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2017.08.134>
 74. Jiang Y, Liu H, Wang L, *et al*(2019) Virus-like organosilica nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and biocatalytic applications. *Biochem Eng J* 144:125–134. <https://doi.org/10.1016/J.BEJ.2019.01.022>
 75. Mesbah NM (2019) Covalent immobilization of a halophilic, alkalithermostable lipase

- LipR2 on Florisil[®] nanoparticles for production of alkyl levulinates. *Arch Biochem Biophys* 667:22–29. <https://doi.org/10.1016/J.ABB.2019.04.004>
76. Song M, Di X, Zhang Y, *et al*(2021) The effect of enzyme loading, alcohol/acid ratio and temperature on the enzymatic esterification of levulinic acid with methanol for methyl levulinate production: a kinetic study. *RSC Adv* 11:15054–15059. <https://doi.org/10.1039/D1RA01780B>
77. Kuwahara Y, Kaburagi W, Nemoto K, Fujitani T (2014) Esterification of levulinic acid with ethanol over sulfated Si-doped ZrO₂ solid acid catalyst: Study of the structure–activity relationships. *Appl Catal A Gen* 476:186–196. <https://doi.org/10.1016/J.APCATA.2014.02.032>
78. Russo V, Rossano C, Salucci E, *et al*(2020) Intraparticle diffusion model to determine the intrinsic kinetics of ethyl levulinate synthesis promoted by Amberlyst-15. *Chem Eng Sci* 228:115974. <https://doi.org/10.1016/J.CES.2020.115974>
79. Imyen T, Saenluang K, Dugkhuntod P, Wattanakit C (2021) Investigation of ZSM-12 nanocrystals evolution derived from aluminosilicate nanobeads for sustainable production of ethyl levulinate from levulinic acid esterification with ethanol. *Microporous Mesoporous Mater* 312:110768. <https://doi.org/10.1016/J.MICROMESO.2020.110768>
80. Methyl Isobutyl Ketone (MIBK) Price, Prices, Pricing | ChemAnalyst. <https://www.chemanalyst.com/Pricing-data/methyl-isobutyl-ketone-68?msclkid=673b6d10c28e11ecadc996aa3ab489ea>. Accessed 23 Apr 2022

4 CONCLUSÃO GERAL DO TRABALHO

Esse estudo mostrou ser uma alternativa interessante na utilização de biocatalisadores para a produção de levulinato de isoamila para obtenção de produtos de interesse industrial. O suporte utilizado (PSty-DVB) possui alta capacidade de imobilização de lipase, uma característica importante para a preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica em meios orgânicos. A imobilização da Eversa® Transform 2.0 nesse suporte é um processo simples e altamente eficaz devido à sua atividade catalítica e baixo custo. Os dados experimentais obtidos, mostraram que a utilização de um solvente polar (MIBC), possivelmente impede a formação de uma camada hidrofílica na superfície do biocatalisador, prevenindo a causa de uma reação reversível (hidrólise do éster) e distorção/inativação enzimática. Sob condições moderadas, uma porcentagem máxima de conversão ácida de cerca de 65% foi alcançada após 12 h de reação. O biocatalisador preparado pode ser facilmente recuperado por filtração e reutilizado após esterificação consecutiva. Além disso, o estudo mostrou-se essa estratégia interessante do ponto de vista industrial, por ser uma tecnologia verde e de baixo, para a produção enzimática de um éster de alto valor agregado.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Uso de óleo fúsel como material de partida, substituindo o álcool isoamílico na produção do éster;
- Aplicação de lipase imobilizada via ligação covalente em diferentes suportes como resíduos agroindustriais ou suportes comerciais para melhorar a estabilização da enzima;
- Caracterização do produto obtido por diferentes técnicas como ressonância magnética nuclear;
- Aplicação do éster preparado para obtenção de produtos interesse industrial como aromatizante em alimentos e como plastificante (produção de filmes poliméricos);