

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

JOSÉ MIGUEL JÚNIOR

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE INTERESSE INDUSTRIAL**

ALFENAS/MG

2024

JOSÉ MIGUEL JÚNIOR

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE INTERESSE INDUSTRIAL**

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Coorientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Gorup

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Miguel Júnior, José.

Aproveitamento de resíduos agroindustriais para a produção enzimática de ésteres de interesse industrial / José Miguel Júnior. - Alfenas, MG, 2024.
76 f. : il. -

Orientador(a): Adriano Aguiar Mendes.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. Ésteres de solkétila. 2. Lipase. 3. Otimização. 4. Óleo de fritura. 5. Macaúba. I. Mendes, Adriano Aguiar, orient. II. Título.

JOSÉ MIGUEL JÚNIOR

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA A PRODUÇÃO
ENZIMÁTICA DE ÉSTERES DE INTERESSE INDUSTRIAL**

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biotecnologia

Aprovada em: 02 de agosto de 2024

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Presidente da Banca Examinadora
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

Profa. Dra. Angélica Marquetotti Salcedo Vieira
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Profa. Dra. Julieta Rangel de Oliveira
Universidade Estadual de Santa Cruz - UESC



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Aguiar Mendes, Presidente**, em 30/08/2024, às 15:00, 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 **1292297** e o código CRC **8BC4001B**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Marlene e José Miguel, que sob muito sol, fizeram-me chegar até aqui, na sombra;

À Universidade, local em que deixei de ser quem não era para me tornar quem sempre fui;

A todos os sonhadores, idealistas e ansiosos, que, assim como nós, acreditam em dias melhores;

E por fim, dedico essa conquista para a criança que fui um dia, que estaria orgulhosa de onde chegou, e para minha criança interior, fonte inesgotável de inspiração e persistência.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus/Universo, que fez com que meus objetivos fossem alcançados, durante todos os meus anos de estudos. Por todas as oportunidades concedidas a mim, e pela força e tranquilidade nos momentos de fraqueza e dificuldades.

Aos melhores pais do mundo, José Miguel e Marlene, em especial a minha mãe, meu alicerce e anjo da guarda, que sempre se sacrificou por mim. E ao meu pai, por me ensinar a ser persistente na busca pelos meus objetivos na vida. Meu eterno respeito e minha eterna gratidão.

Às minhas irmãs, Naira e Edilaine, que sempre me incentivaram a estudar e, desde a infância, me ajudaram com as tarefas escolares quando meus pais não podiam. Vocês com certeza fazem parte de quem sou hoje. Obrigado por me motivarem nos momentos mais difíceis, permitindo que eu superasse cada obstáculo em meu caminho e chegasse até aqui.

Minha profunda gratidão ao Professor Doutor Adriano Aguiar Mendes, meu orientador e, acima de tudo, um querido e grande amigo. Agradeço pela pessoa e profissional que é, pelo apoio incondicional e pela disponibilidade na execução deste trabalho. Obrigado pela compreensão diante de algumas dilações, pelos conselhos assertivos e por sempre me instigar na busca pelo conhecimento. E, principalmente, muito obrigado por acreditar e confiar em mim. Sem sua orientação, apoio, confiança e amizade, não só neste trabalho, mas ao longo de todo o caminho percorrido até aqui, nada disso seria possível.

Um agradecimento especial aos meus colegas de laboratório, Fernanda Rocha Mattos e Guilherme José Sabi, por compartilharem comigo tantos momentos de descobertas e aprendizado e por todo o companheirismo ao longo deste percurso. Além das conversas diárias cheias de humor duvidoso, o que fez com que a caminhada fosse bem mais leve. Obrigado pela amizade, pela atenção e por serem tão solícitos nesta caminhada.

Aos alunos de Iniciação Científica do grupo de pesquisa, João Vitor e Nalanda, que me acompanharam nos experimentos com dedicação e competência, além de estarem sempre dispostos a me ajudar.

Aos meus amigos de Paraguaçu, minha segunda família, quero expressar minha profunda gratidão por sempre me encorajarem a perseguir meus objetivos e por me ajudarem a manter a motivação nos momentos difíceis.

À Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), essencial no meu processo de formação profissional, pela dedicação e por tudo o que aprendi ao longo dos anos, além de disponibilizar os laboratórios e equipamentos necessários para a realização deste trabalho.

Agradeço imensamente aos membros do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) pelo suporte, especialmente aos professores do programa. Seus ensinamentos foram numerosos e certamente contribuíram de forma positiva para a minha formação.

A todos os que contribuíram, de alguma forma, para a realização deste trabalho.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-01691-21) pelo suporte financeiro e pela concessão da bolsa, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processos 404929/2016-8 e 310633/2020-6), e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo suporte financeiro.

RESUMO

Nas últimas décadas, tem-se observado um grande esforço voltado para o desenvolvimento de novos processos sustentáveis de reciclagem e gestão de resíduos agroindustriais, como óleos vegetais usados e resíduo de biomassa lignocelulósica. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi propor uma nova abordagem na produção enzimática de ésteres de solketal, uma classe de compostos de grande interesse na indústria oleoquímica, por hidroesterificação enzimática do óleo de soja usado (OSU). Para tal fim, inicialmente, aprimorou-se a o biocatalizador heterogêneo, onde a lipase Eversa[®] Transform 2.0 (ET2.0) foi imobilizada em partículas do epicarpo (casca) de *Acrocomia aculeata* (macaúba), as quais foram submetidas a dois pré-tratamentos ácidos e dois tratamentos com etanol 70% antes da imobilização. Após isso, foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios X (XRD) e espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) para avaliar a influência dos métodos de pré-tratamentos nas partículas do epicarpo da macaúba. O biocatalizador heterogêneo foi preparado via adsorção física de ET2.0 a 25 °C em pH 5,0 (tampão acetato de sódio – 5 mmol.L⁻¹) empregando um carregamento de proteína de 40 mg.g⁻¹ de suporte. Nessa etapa, a máxima concentração de proteína imobilizada de 25,2 ± 1,3 mg.g⁻¹ foi obtida em 15 h de imobilização. Posteriormente, realizou-se a hidrólise completa do óleo de soja usado catalisado por lipase de *Candida rugosa* (LCR) para a produção de ácidos graxos livres (AGL). A etapa de produção dos AGL por hidrólise enzimática foi conduzida em um sistema isento de emulsificantes e agentes tamponantes empregando razão mássica óleo:água de 40% m.m⁻¹, concentração de LCR de 3,2 g do preparado comercial em pó por Kg de meio, 40 °C e agitação mecânica de 1500 rpm. Após estas etapas, as reações de esterificação foram conduzidas em frascos abertos contendo 6 g de meio reacional constituído por uma mistura de AGL e solketal, agitação mecânica de 240 rpm e tempo de 40 min de reação. Nesta etapa, a influência de fatores relevantes na etapa de esterificação como razão molar solketal:AGL (1:1 a 1:4), temperatura de reação (40 a 70°C), e concentração de biocatalisador (5 a 20% m.m⁻¹) foi avaliada por delineamento composto central rotacional (DCCR). De acordo com os resultados, a máxima conversão do ácido da ordem de 72.5 ± 0.8% foi alcançada após 150 min de reação conduzida a 46 °C, 20% m.m⁻¹ de biocatalisador, e razão molar AGL:solketal de (1:1,6). Nesta mesma condição, testes de reuso foram

realizados a fim de analisar a estabilidade do biocatalisador. O biocatalisador reteve 70% da sua atividade original após dez ciclos sucessivos. A produção dos ésteres de solketila foi confirmada por FT-IR e ressonância magnética nuclear (RMN ^1H e RMN ^{13}C). Estes resultados mostram que a estratégia proposta neste trabalho é altamente atrativa para a indústria química, para o estabelecimento de processos eficientes e sustentáveis a partir de resíduos agroindustriais (casca de macaúba e óleo residual).

Palavras-chave: Ésteres de solketila; Hidroesterificação; Óleo de soja usado; Otimização; Lipase; Macaúba.

ABSTRACT

In the last decades, a significant effort has been directed toward the development of new sustainable processes for recycling and managing agro-industrial waste, such as waste vegetable oils and lignocellulosic biomass waste. In this context, this work aimed to propose a new approach in the enzymatic production of solketal esters, a class of compounds of great interest in the oleochemical industry, via enzymatic hydroesterification of used soybean cooking oil (USCO). For such a purpose, a heterogeneous biocatalyst was initially produced, which the lipase Eversa[®] Transform 2.0 (ET2.0) was immobilized on particles of *Acrocomia aculeata* (macaúba) epicarp (peel), which underwent two acid pre-treatments and two treatments with 70% ethanol before immobilization. Subsequently, scanning electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), and Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) analyses were performed to evaluate the influences of the pretreatment methods on macaúba epicarp particles. The biocatalyst was prepared via physical adsorption of ET2.0 at 25 °C in pH 5.0 (sodium acetate buffer – 5 mmol.L⁻¹) offering a protein loading of 40 mg.g⁻¹ of support. In this step, the maximum immobilized protein concentration of 25.2 ± 1.3 mg.g⁻¹ was achieved after 15 hours of immobilization. Afterward, the complete hydrolysis of used soybean oil catalyzed by *Candida rugosa* lipase (CRL) was carried out to produce free fatty acids (FFAs). The enzymatic hydrolysis step for FFA production was performed in an emulsifier-free and buffer-free system using a mass ratio of oil:water of 40% m.m⁻¹, a CRL concentration of 3.2 g of commercial powder per kg of medium, 40 °C, and mechanical stirring at 1500 rpm. Following this step, esterification reactions were performed in open flasks containing 6 g of reaction medium consisting of a mixture of FFAs and solketal, mechanical agitation at 240 rpm, and a reaction time of 40 minutes. In this stage, the influence of relevant factors in the esterification step such as solketal:FFA molar ratio (1:1 to 1:4), reaction temperature (40 to 70°C), and biocatalyst concentration (5 to 20% m.m⁻¹) was evaluated using a central composite rotatable design (CCRD). According to the results, a maximum acid conversion of approximately 72.5 ± 0.8% was achieved after 150 minutes of reaction conducted at 46 °C, 20% m.m⁻¹ of biocatalyst, and a molar ratio of (1:1.6) of FFA:solketal. Under this condition, reusability tests were performed to analyze the stability of the biocatalyst. The biocatalyst retained 70% of its original activity after ten successive cycles. The production of solketal esters was confirmed by FT-IR and

nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR and ^{13}C NMR). These results demonstrate that the strategy proposed in this work is very attractive for the chemical industry, for establishing efficient and sustainable processes from agro-industrial waste (macaúba epicarp and waste oil).

Keywords: Solketal esters; Hydroesterification; Used soybean cooking oil; Optimization; Lipase; Macauba.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da reação de acetalização do glicerol com acetona para síntese do solketal.....	22
Figura 2 - Representação da “tampa”da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> na forma fechada (PDB:1DTE) e forma aberta (PDB: 1EIN).....	24
Figura 3 - Esquema de imobilização por ativação interfacial em suporte hidrofóbico.....	25
Figura 4 - Representação geral da reação de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases	27
Figura 5 - Representação da reação de esterificação.....	27

LISTA DE ABREVIATURAS

OVU	Óleo vegetal usado
OSU	Óleo de soja usado
TAG	Triacilgliceróis
AGL	Ácidos graxos livres
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
ET2.0	Eversa® Transform 2.0
EGS	Ésteres graxos de Solketila
DCCR	Delineamento composto central rotacional
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
FT-IR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier
RMN ¹H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de carbono-13

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
3.1	ÓLEO VEGETAL USADO.....	19
3.2	SOLKETAL.....	21
3.3	LIPASES E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	23
3.4	HIDROESTERIFICAÇÃO.....	26
3.5	MACAÚBA: UMA PROPOSTA DE SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES.....	28
4	ARTIGO 1 - BIOCATALYTIC PRODUCTION OF SOLKETAL ESTERS FROM USED OIL UTILIZING TREATED MACAUBA EPICARP PARTICLES AS LIPASE IMMOBILIZATION SUPPORT: A DUAL VALORIZATION OF WASTES FOR A SUSTAINABLE CHEMISTRY.....	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	71

1 INTRODUÇÃO

No cenário atual, as demandas energéticas são majoritariamente atendidas pela utilização de combustíveis fósseis. Uma vez que estes recursos energéticos não são renováveis, a sobre-exploração desses recursos resultará numa crise energética nas próximas décadas (Bhatia *et al.*, 2020). A crescente relevância das questões ambientais, notadamente o aquecimento global e as alterações climáticas, tem proporcionado um aumento de interesse na busca por fontes de energia potencialmente sustentáveis (Ang *et al.*, 2022).

Nesse sentido, observa-se ao longo das últimas décadas um grande esforço voltado para o desenvolvimento de novos processos sustentáveis de reciclagem e gestão de óleos alimentares usados (Mannu; Ferro; Di Pietro, 2019). Atualmente, os óleos vegetais comestíveis mais utilizados em aplicações oleoquímicas são obtidos a partir de palma africana, soja, colza, girassol, palmiste, caroço de algodão e coco (Baena *et al.*, 2022). Grande parte desse material é destinado a indústria de alimentos e posteriormente utilizados no preparo de alimentos, gerando uma elevada quantidade de material residual. A quantidade de óleos vegetais residuais disponíveis em todo o mundo é extremamente relevante, o qual ocasiona em sérios problemas ambientais, econômicos e sociais. Estimativas apontam que mais de 15 milhões de toneladas de óleos vegetais residuais sejam geradas anualmente no mundo, entre os quais a União Europeia se aproxima de 1 milhão de toneladas por ano (De Feo *et al.*, 2023).

Os óleos vegetais residuais são predominantemente constituídos de triacilgliceróis, monoacilgliceróis, e diacilgliceróis com quantidades variadas (De Feo *et al.*, 2023). Estes podem ser hidrolisados em ácidos graxos livres e glicerol. Compostos derivados de lipídios e glicerol, são oleoquímicos básicos potencialmente usados como matérias-primas para a preparação de uma variedade de compostos químicos e produtos de alto valor agregado. Dentre esses produtos destacam-se lubrificantes, aditivos para combustíveis, corantes, solventes, fragrâncias, cosméticos, polímeros, entre outros (Zahid *et al.*, 2020; Baena *et al.*, 2022). Esta abordagem visa maximizar, o uso de biorresíduos, recuperando recursos valiosos e, ao mesmo tempo, enfrentando o problema do descarte inadequado. Nesse sentido, uma das aplicações mais comuns do óleo vegetal usado é a sua utilização como matéria-prima na produção de biodiesel (De Feo *et al.*, 2023).

A produção global de biodiesel nos últimos anos resultou em um grande volume de glicerol como subproduto, o qual se tornou uma matéria-prima promissora para a síntese sustentável de inúmeros produtos químicos de valor agregado, incluindo o solketal— (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il) metanol ou 1,2-o-isopropilideno glicerol, um composto usado como aditivo de combustível para reduzir a emissão de partículas e melhorar as propriedades de fluxo a frio dos combustíveis. Atualmente, o solketal é sintetizado via reação de acetalização entre o glicerol e acetona utilizando catalisadores ácidos homogêneos ou heterogêneos. O solketal tem sido usado com sucesso na síntese de uma variedade de ésteres graxos do mesmo (EGS) empregados como potenciais aditivos de combustível, solventes, lubrificantes, agentes aromatizantes e plastificantes. Além disso, ésteres à base de solketal são agentes emulsificantes promissores dos quais apresentam excelentes propriedades antimicrobianas regularmente utilizadas nas formulações de alimentos, cosméticos e cuidados pessoais (Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020).

Em geral, os ésteres à base de solketal são sintetizados por reações de esterificação ou transesterificação utilizando catalisadores clássicos homogêneos ou heterogêneos. Apesar dos catalisadores químicos serem amplamente utilizados em processos industriais, o uso de enzimas como catalisadores apresenta vantagens, como alta seletividade e especificidade sob condições de reação moderadas (Itabaiana, I. *et al.*, 2013; Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020; Souza *et al.*, 2020). EGSs sintetizados utilizando lipases como biocatalisadores obtiveram uma atenção especial em razão às condições de reação suaves e a alta seletividade do catalisador (Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020).

As lipases (triacilglicerol-acil hidrolases, EC 3.1.1.3) têm despertado um crescente interesse global em virtude da sua extensa gama de aplicações nos âmbitos científico e industrial. Contudo, o uso de lipase na sua forma solúvel pode apresentar algumas limitações, como instabilidade operacional, baixa estabilidade térmica e de pH e difícil recuperação do meio para utilização em ciclos posteriores. O uso de técnicas de imobilização enzimática em suportes sólidos leva à obtenção de biocatalisadores heterogêneos, ativos e estáveis, facilitando sua posterior separação e reutilização (Lozano *et al.*, 2016; Rodrigues *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020).

A imobilização enzimática pode levar a alterações na atividade, especificidade ou seletividade da enzima, isto devido às interações enzima-suporte, o que geralmente leva à melhoria do seu desempenho catalítico (Lozano *et al.*, 2016;

Rodrigues *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2020). Desta maneira, os tipos de suportes empregados na imobilização de lipases são bastante importantes, visto que sua interação com moléculas enzimáticas pode influenciar na atividade e a estabilidade das lipases quando imobilizadas. Derivados poliméricos naturais, polímeros sintéticos, cerâmicas, materiais inorgânicos nanoestruturados são exemplos de suportes que podem ser usados em técnicas de imobilização de enzimas (Thangaraj *et al.*, 2019; Zucca *et al.*, 2016).

Recentemente, o emprego de resíduos agroindustriais como suportes de imobilização de enzimas têm sido objeto de estudo de diversas pesquisas em todo o mundo (Costa-Silva *et al.*, 2022; Girelli *et al.*, 2020; Liu, Shan *et al.*, 2019, Sabi *et al.*, 2022). Embora a literatura tenha documentado o uso de vários suportes que se mostram estáveis mesmo em condições extremas, muitos destes não se encontram prontamente disponíveis ou possuem um custo elevado (Girelli *et al.*, 2020). Normalmente, as biomassas lignocelulósicas podem ser submetidas a modificações físicas e/ou químicas. Em vista da sua utilização em procedimentos de imobilização, um estágio de pré-tratamento é essencial para aprimorar a afinidade entre o suporte e o biocatalisador, resultando em uma melhoria na eficiência do processo de imobilização (Rodríguez-Restrepo; Orrego, 2020).

Dentre os resíduos disponíveis, os resíduos do fruto da macaúba (*Acrocomia aculeata*) surge como uma alternativa promissora. Esta palmeira oleaginosa altamente produtiva, pertencente à família Arecaceae, é nativa das regiões tropicais da América Latina, com predominância de ocorrência nas áreas geográficas correspondentes às regiões Sudeste e Centro-Oeste do território brasileiro. O fruto da macaúba é rico em óleo, o qual se concentra tanto na polpa quanto no caroço (semente) do fruto. Esta planta apresenta elevada produtividade, isso devido aos seus frutos capazes de gerar mais de 5.000 Kg de óleo por hectare anualmente. O óleo proveniente do fruto da macaúba, possui aplicações em diversas indústrias, incluindo alimentícia, farmacêutica e cosmética. Além disso, apresenta-se como uma alternativa viável para a produção de biodiesel (Del Río *et al.*, 2016). Outra vantagem é a possibilidade de utilizar todas as partes do fruto – exocarpo (casca), mesocarpo (polpa), endocarpo (noz) e semente (caroço) – para produção de coprodutos que possuem um grande valor econômico (Castro *et al.*, 2017). Toda a sua biomassa pode ser utilizada para várias finalidades, incluindo bioenergia, alimentação e uma infinidade de outros produtos. Os resíduos sólidos, oriundos da etapa de extração do óleo, podem fornecer

tortas de proteínas e fibras, briquetes (lenha ecológica proveniente de resíduos), carvão vegetal e, conforme já mencionado, ser utilizado como um potencial suporte para a imobilização de enzimas (Castro *et al.*, 2017; Bijoy *et al.*, 2022; Da Costa Lima Pires *et al.*, 2023; Girelli; Chiappini, 2023).

Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver um processo sustentável para produção de ésteres de solketa, um potencial bioplastificante, a partir de óleo de soja usado (OSU) por meio de um processo de duas etapas (hidroesterificação). Este processo compreendeu a etapa inicial de hidrólise do OSU para obtenção de ácidos graxos livres (AGL), seguida pela esterificação dos AGL com solketal comercial. Na etapa de hidrólise, empregou-se um sistema isento de emulsificantes e tampão, fazendo uso da lipase não específica de *Candida rugosa*. Na etapa de esterificação a lipase Eversa[®] Transform (ET2.0) foi imobilizada em partículas de epicarpo de macaúba, as quais foram submetidas a dois pré-tratamentos ácidos e dois tratamentos com etanol 70% antes da imobilização. Um planejamento experimental foi conduzido para as reações de esterificação entre ácidos graxos de OSU e solketal. Foram investigadas as variáveis temperatura, concentração de catalisador e razão molar entre o solketal e o ácido graxo. Ademais, estudou-se o efeito do tempo nas condições otimizadas para avaliar a eficiência catalítica do biocatalisador heterogêneo preparado na síntese dos ésteres de solketa. Testes de reuso foram realizados a fim de analisar a estabilidade do biocatalisador preparado após sucessivas bateladas de esterificação.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um processo sustentável e ecologicamente correto para a produção de ésteres de solketila, um éster com potencial aplicação como bioplastificante, a partir do óleo de soja usado (OSU) e solketal. O objetivo geral desse trabalho foi alcançado mediante a execução dos seguintes objetivos específicos descritos a seguir:

- a) utilizar partículas do epicarpo de Macaúba como suporte para imobilização de enzimas, em específico a lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzido por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (Eversa® Transform 2.0 – ET2.0);
- b) produzir AGL a partir da hidrólise enzimática do OSU catalisada pela lipase de *Candida rugosa* (LCR);
- c) aplicar o biocatalisador heterogêneo preparado para a esterificação do AGL com solketal, em reator aberto em meio isento de solventes;
- d) avaliar a influência de fatores como razão molar AGL: Solketal, concentração do catalisador e temperatura na produção de ésteres de solketila, por delineamento composto central rotacional (DCCR) em 40 minutos de reação;
- e) avaliar o efeito do tempo de reação na produção de ésteres de solketila nas condições otimizadas;
- f) estudar o reuso do biocatalisador nas condições otimizadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEO VEGETAL USADO

Os óleos vegetais desempenham um grande papel na indústria química, isso, em virtude à sua intrínseca biodegradabilidade, acessibilidade e modificações versáteis. Ainda mais, sua importância está associada a questões ambientais e pela crescente escassez de fontes de petróleo (Wai *et al.*, 2019). Nos anos de 2022 e 2023 a produção de óleo vegetal alcançou cerca de 210,3 milhões de toneladas métricas em todo o mundo, logo, prevê-se que sua produção resulte em mais de 217 milhões de toneladas métricas na campanha de comercialização entre 2023 e 2024 (Statista, 2024a). Os óleos vegetais e as gorduras animais constituem as principais matérias-primas utilizadas na indústria oleoquímica e são amplamente utilizados na fabricação de uma ampla variedade de derivados. Os óleos são predominantemente constituídos por triacilgliceróis, que possuem diferentes comprimentos de cadeia e características químicas. Sua concentração e natureza são determinadas principalmente pela fonte biológica correspondente (Noor Amylissas *et al.*, 2017; Baena *et al.*, 2022; Mannu *et al.*, 2019).

Por sua vez, no Brasil, a soja destaca-se como uma das culturas mais relevantes na agricultura, representando mais de um terço do valor total da produção do setor em 2022. Em âmbito global, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos na safra 2019/2020, rompendo anos de vice-liderança para se tornar o maior produtor dessa oleaginosa. De acordo com previsões, a produção de soja no Brasil deve continuar crescendo na próxima década, alcançando aproximadamente 154 milhões de toneladas até 2032 (Statista, 2024b). O consumo de óleo de soja no Brasil aumentou mais de 40% ao longo de uma década, alcançando cerca de 7,8 milhões de toneladas em 2022/23 (Statista, 2022). Além do setor agrícola e alimentício, o óleo de soja é a principal matéria-prima utilizada na produção de biodiesel no Brasil (Statista, 2024b).

O óleo vegetal usado (OVU) emerge como uma fonte importante de resíduos oleosos, sendo representado por cerca de 50 kg de produção anual per capita em países desenvolvidos. No mundo todo, são gerados cerca de 29 milhões de toneladas de resíduos lipídicos, no qual grande parte deste volume é descartado convencionalmente com os resíduos sólidos urbanos em aterros sanitários ou na rede de esgoto (Gaur *et al.*, 2022; Hosseinzadeh-Bandbafha; Nizami *et al.*, 2022). O

descarte de óleos usados em aterros pode ocasionar na poluição dos recursos hídricos e do solo e, conseqüentemente, perturbar o ecossistema. Já nas redes de esgotos, pode haver redução do diâmetro das tubulações e conseqüentemente obstruções, levando a prejuízos econômicos e ambientais. Além disso, os OVUs possuem baixa solubilidade na água, acarretando de modo negativo a flora e fauna aquáticas, reduzindo o teor de oxigênio dissolvido e restringindo a penetração da luz solar na água (Hosseinzadeh-Bandbafha; Nizami *et al.*, 2022). As refinarias e as indústrias de alimentos representam uma fonte relevante desses resíduos, o que ainda podem ser utilizados como um substrato de alto valor (Gaur *et al.*, 2022).

Apesar da crescente adoção de recursos de base biológica e renováveis terem alcançado uma utilização significativa na indústria química, é fundamental ter consciência dos impactos relacionados ao ciclo de vida das matérias-primas de base agrícola. Uma melhor percepção do nexo entre água, energia e segurança alimentar redirecionou a atenção para a recuperação e aproveitamento de resíduos de base biológica (Baena *et al.*, 2022).

Com o início das biorrefinarias, revelou-se uma abordagem mais promissora e mais viável para os problemas existentes decorrentes da acumulação de resíduos não tratados no meio ambiente (Gaur *et al.*, 2022). A possibilidade de transformar o óleo vegetal usado (OVU) em compostos de alto valor, associada à necessidade de evitar a sua dispersão no meio ambiente e à sua disponibilidade em quantidades muito grandes, levou muitas indústrias a direcionarem investimentos para o processamento de OVUs. As aplicações mais comuns desses óleos reciclados estão na produção de biolubrificantes, emprego como ração animal e sua utilização na produção de energia (seja a queima direta ou como ingrediente combustível (biodiesel)). Além disso, algumas aplicações de OVUs envolvem a produção de solventes biodegradáveis, assim como aditivos para bioasfaltos e bioconcreto (Manu; Ferro; Dugoni *et al.*, 2019).

Os OVUs são constituídos principalmente de triacilgliceróis (TAG), monoacilgliceróis e diacilgliceróis, acompanhados de quantidades variáveis de ácidos graxos livres (AGL) (5% a 20% m/m) gerados durante o processo de fritura. Os triacilgliceróis possuem na sua composição, majoritariamente, ácidos graxos saturados e insaturados, os quais possuem o potencial para ser utilizados como precursores químicos para a fabricação de produtos de valor agregado em diversos segmentos da indústria (Manu; Ferro; Di Pietro *et al.*, 2019). A maioria das

transformações químicas clássicas e bem estabelecidas utilizando ácidos graxos e seus derivados ocorrem no grupo carboxila terminal. Como exemplo, reações de esterificação, amidação e aminação para gerar ésteres, amidas e aminas, o que, respectivamente, são usados como precursores químicos (Noor Armylisas *et al.*, 2017).

3.2 SOLKETAL

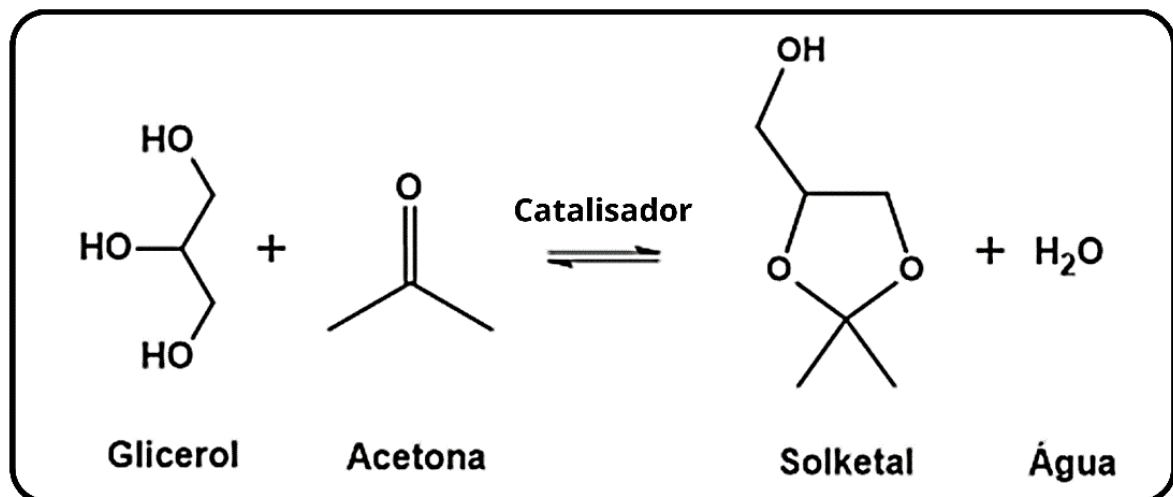
Atualmente, a manufatura do biodiesel provém na sua maior parte da reação de transesterificação entre um óleo e um álcool (como o metanol). A reação de transesterificação fornece dois produtos principais: os ésteres metílicos/etílicos dos ácidos graxos, ou seja, o próprio biodiesel, e um valioso subproduto: o glicerol. Cerca de 68% do suprimento de glicerol provém da indústria de biodiesel e o crescimento esperado na oferta dessa *commodity* acompanha a indústria de biocombustíveis, estimando-se uma taxa de crescimento de 5,2% até 2027 (Corrêa; Faria; Rodrigues, 2021). Estima-se que para cada 100 kg de biodiesel produzido sejam gerados aproximadamente 10 kg de glicerol bruto (Rodrigues *et al.*, 2021). Portanto, faz-se necessário desenvolver novas formas que sejam economicamente viáveis para a utilização do glicerol bruto visando aumentar o seu valor e reforçar a sustentabilidade das indústrias de biodiesel (Nanda *et al.*, 2016).

Dentre os produtos químicos de interesse obtidos a partir do glicerol está o solketal ((2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-il) metanol) ou 1,2-isopropilidenglicerol, um cetol cíclico oxigenado com dois grupos metil. O solketal pode ser utilizado como aditivo de combustível para melhorar as propriedades de fluxo em baixa temperatura, bem como, agente aromatizante, base para produção de surfactantes, solvente para aplicações médicas e intermediário para manipulações químicas (Khodadadi *et al.*, 2021; Sedghi *et al.*, 2022; Sulisty *et al.*, 2020).

Considerando que o biodiesel está incorporado à matriz energética brasileira, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) planeja aumentar anualmente o teor de biodiesel no diesel proveniente do petróleo. Em 2024, o percentual subirá para 13%; em 2025, atingirá 14%; e em 2026, chegará a 15% (Brasil, 2024). Como resultado, o volume de glicerol gerado pela indústria de biodiesel nacional aumentará, podendo levar a uma maior produção de solketal.

Em 2020, o mercado global do solketal foi cerca de US\$ 19 milhões (Khodadadi *et al.*, 2021). Estimativas mostram que até 2026, o mercado do solketal alcance aproximadamente US\$ 13 milhões, com uma taxa de crescimento anual de 6,5% ao longo desse período (Khodadadi *et al.*, 2021). Em geral, o solketal é produzido pela acetalização do glicerol com acetona na presença de um catalisador ácido, tendo a água como subproduto, como mostrado na Figura 1. Uma série de catalisadores ácidos homogêneos, incluindo ácidos minerais (H_2SO_4 , HCl , H_3PO_4), ácido orgânico como o p-toluenossulfônico, sais metálicos (FeCl_3 , SnCl_2), são reportados na literatura para a produção do solketal (Corrêa; Faria; Rodrigues, 2021; Khodadadi *et al.*, 2021). Com o êxito da acetalização do glicerol, houve também um aumento do interesse na produção de “solketal” como solvente e plastificante (Shirani; Ghaziaskar; Xu, 2014).

Figura 1 - Representação da reação de acetalização do glicerol com acetona para síntese do solketal.



Fonte: Do autor.

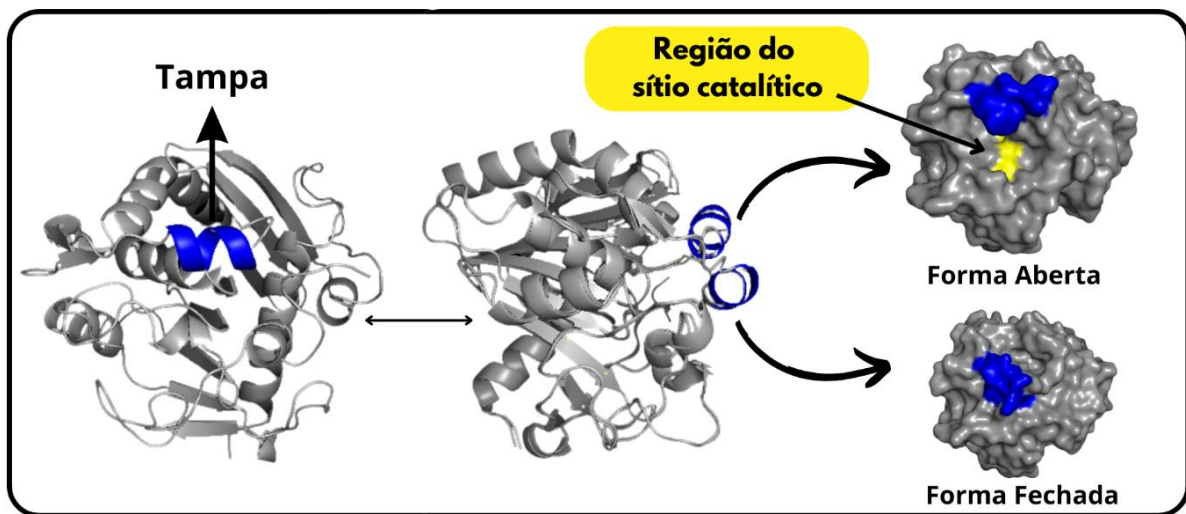
A existência do grupo hidroxila ($-\text{OH}$) na estrutura molecular do solketal possibilita sua utilização como uma fonte de álcool na síntese de ésteres, dentre eles ésteres graxos de solketila (EGS). Em uma abordagem alternativa, a obtenção de EGSs também pode ser efetuada por meio da esterificação entre ácidos graxos e solketal, utilizando lipases imobilizadas e ácido p-toluenossulfônico. O EGS obtido revela-se passível de aplicação em diversos setores, tais como aditivos para combustíveis, lubrificantes, solventes, agentes aromatizantes, plastificantes, entre outros (Zahid *et al.*, 2020).

3.3 LIPASES E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A biotecnologia industrial ganhou destaque pela ampla utilização de enzimas como catalisadores. Estima-se que o mercado de enzimas, cujo valor estimado estava em 9,9 bilhões de dólares no ano de 2019, tenha um crescimento com uma taxa anual de 7,1% no período entre 2020 e 2027 (Almeida *et al.*, 2021). Lipases (EC 3.1.1.3) são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (TAG) em glicerol e ácidos graxos livres (AGL)(Melani; Tambourgi; Silveira, 2020). Entre as enzimas com grande interesse industrial, as lipases ocupam a primeira posição (Monteiro *et al.*, 2023; Rodrigues *et al.*, 2019). Evidentemente, as lipases representam as enzimas mais utilizadas em processos de biotransformações, isto devido à sua ampla especificidade de substrato, acessibilidade comercial, independência de cofatores e capacidade de operar em altas concentrações de substrato, não apenas em seu ambiente natural (soluções aquosas), mas também em solventes orgânicos (Melani *et al.*, 2020; Rodrigues *et al.*, 2019). Embora sejam as mais usadas em reações de hidrólise e esterificação de óleos, as lipases podem catalisar uma ampla gama de reações, incluindo transesterificação, interesterificação, acidólise, alcoólise e aminólise. A multifuncionalidade das lipases possibilita sua aplicação em diversos setores, incluindo alimentos, cosméticos, bebidas, biossensores, produção de biodiesel, entre outras (Almeida *et al.*, 2021).

As lipases, de modo geral, apresentam uma cadeia polipeptídica amplamente denominada de “tampa”, conforme ilustrado na Figura 2. Essa estrutura possui uma face interna hidrofóbica e face externa hidrofílica. Na conformação fechada das lipases, a área hidrofóbica da tampa interage com as áreas hidrofóbicas que circundam o centro ativo, isolando-o do meio reacional. Ao se interagir com o substrato (hidrofóbico), a tampa se movimenta promovendo a exposição do sítio catalítico, o qual se configura como a conformação aberta da lipase. Este mecanismo é chamado de “ativação interfacial”. O sítio ativo das lipases é geralmente caracterizado por uma tríade de aminoácidos composta por serina, histidina e aspartato ou glutamato (Melani; Tambourgi; Silveira, 2020; Parandi *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2019; Sarmah *et al.*, 2018).

Figura 2 - Representação da “tampa” da lipase de *Thermomyces lanuginosus* na forma fechada (PDB: 1DT3) e forma aberta (PDB: 1EIN).



Fonte: Do autor.

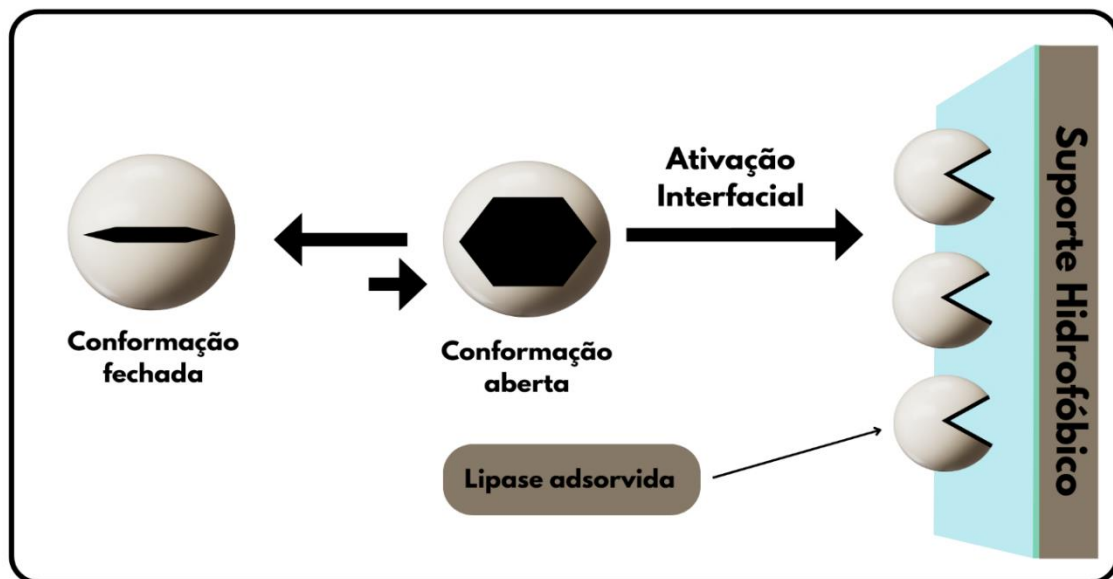
Apesar da ampla versatilidade das enzimas, sua implementação em larga escala pode apresentar desafios. Algumas limitações associadas ao uso de enzimas solúveis em processos industriais incluem custos elevados, baixa estabilidade operacional e dificuldades na recuperação. Contudo, as enzimas oferecem a vantagem do potencial reutilização, o qual necessita da sua recuperação do processo para uma posterior reutilização, contribuindo assim, para a viabilidade econômica do processo. A recuperação de enzimas livres no meio reacional pode ser difícil e uma alternativa que facilita a sua recuperação é a utilização de enzimas imobilizadas (Gonçalves Filho; Silva; Guidini, 2019; Thangaraj; Solomon, 2019; Zahirinejad *et al.*, 2021). Atualmente, a etapa de imobilização enzimática demonstrou ser uma ferramenta atrativa para aprimorar diversas características das enzimas. Uma imobilização eficiente busca melhorar as limitações enzimáticas, como sua estabilidade, atividade, seletividade, especificidade, ou resistência a inibidores (Liu *et al.*, 2018; Miguel Júnior *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2019)

Com base nessas vantagens, as enzimas imobilizadas têm sido amplamente aplicadas em diversos campos, como na indústria alimentícia, indústria farmacêutica, tratamento de águas residuais, indústria têxtil e assim por diante (Liu *et al.*, 2018). Diversas técnicas têm sido extensivamente estudadas para imobilização enzimática, incluindo adsorção física, ligação covalente, encapsulamento, reticulação e aprisionamento (Gonçalves Filho; Silva; Guidini, 2019). Neste contexto, a imobilização enzimática pelo método de adsorção física destaca-se pela sua simplicidade,

facilidade e menor custo em comparação a outros métodos (Rodrigues *et al.*, 2019).

As lipases, quando em contato com superfícies hidrofóbicas, levam à exposição do seu sítio ativo, devido a mudança da enzima para a conformação aberta. Assim, têm-se a sua adsorção na superfície, levando à fixação de uma estrutura aberta na qual o sítio ativo fica totalmente exposto. Em outras palavras, a presença de superfícies hidrofóbicas induz o movimento da tampa das lipases, permitindo com que a mesma permaneça na conformação aberta durante o processo de adsorção, promovendo um aumento da sua atividade catalítica (Figura 3). Muitos pesquisadores têm explorado com sucesso essas estratégias para imobilizar lipases em suportes hidrofóbicos. Isso elimina a necessidade de abertura da lipase por outras interfaces externas, garantindo a imobilização das lipases na forma monomérica e aberta (Mattos *et al.*, 2023; Miguel Júnior *et al.*, 2022; Parandi *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2019).

Figura 3 - Esquema de imobilização por ativação interfacial em suporte hidrofóbico.



Fonte: Do autor.

Em certos casos, as lipases imobilizadas podem exibir uma atividade catalítica superior quando comparadas com sua forma livre (Rodrigues *et al.*, 2019). Um dos aspectos vantajosos das reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases imobilizadas, é a capacidade de conduzi-las em sistemas livres de solventes orgânicos. Essa abordagem oferece benefícios significativos em relação aos sistemas que utilizam esses solventes (Mattos *et al.*, 2023; Miguel Júnior *et al.*, 2022). Além disso, ésteres produzidos por rotas biocatalíticas podem ser rotulados como produtos

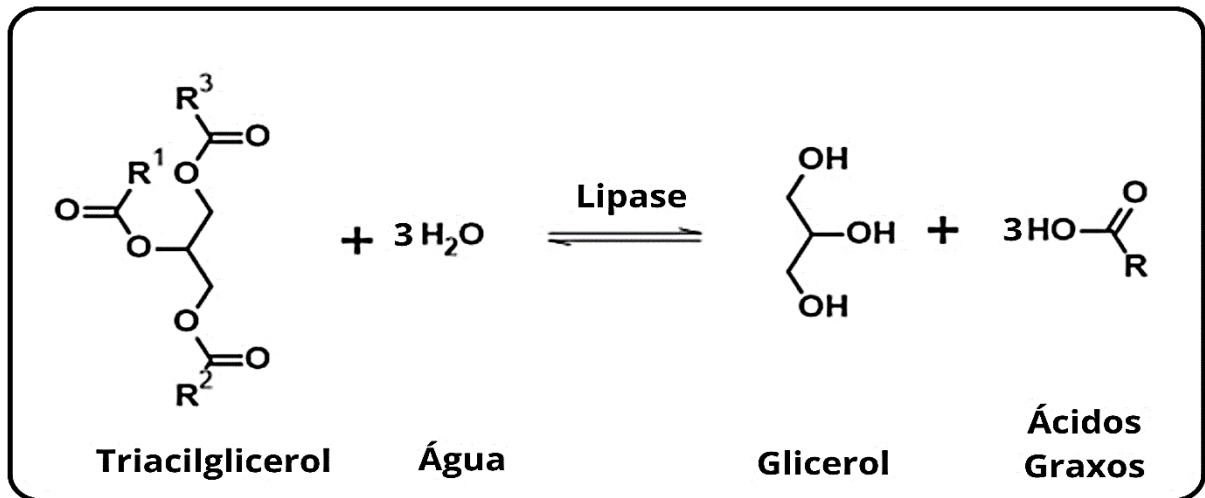
verdes, com as vantagens que isso tem na sua comercialização e possível preço (Miguel Júnior *et al.*, 2022).

3.4 HIDROESTERIFICAÇÃO

O processo de hidroesterificação é um processo que pode ser realizado em duas etapas, a primeira é a hidrólise dos TAGs seguido da esterificação dos AGLs com um álcool de interesse. Essa técnica tem se demonstrado vantajosa para produção de ésteres industriais, visto que a transesterificação enzimática direta de triacilgliceróis requer tempos de reação longos ou altas temperaturas para alcançar altos rendimentos (Guedes Júnior *et al.*, 2022; Mattos *et al.*, 2023). Atualmente, os AGLs industriais são predominantemente produzidos através da hidrólise de óleos e gorduras utilizando condições operacionais extremas, isso mediante a processos que requerem um elevado consumo energético (como por exemplo, os processos Colgate-Emery e Eisenlohr). Esses processos envolvem altas temperaturas e pressões (aproximadamente 250 °C e 50 bar), e tais condições são indispensáveis para promover a miscibilidade entre óleo e água, para reduzir a viscosidade do óleo, superar limitações do equilíbrio e alcançar uma cinética reacional mais rápida (Baena *et al.*, 2022; Tavares *et al.*, 2021). Ademais, esses processos demandam a utilização de equipamentos caros e resultam em altas despesas operacionais, assim como, desencadeiam reações secundárias indesejáveis (Baena *et al.*, 2022).

Catalisadores enzimáticos têm atraído um grande interesse recentemente devido a sua notável atividade em condições mais brandas, bem como à sua elevada regioseletividade e especificidade em relação ao substrato (Baena *et al.*, 2022). Os ácidos graxos livres, por exemplo, podem ser produzidos por meio do processo de hidrólise enzimática de óleos (Souza *et al.*, 2020), como demonstrado na Figura 4.

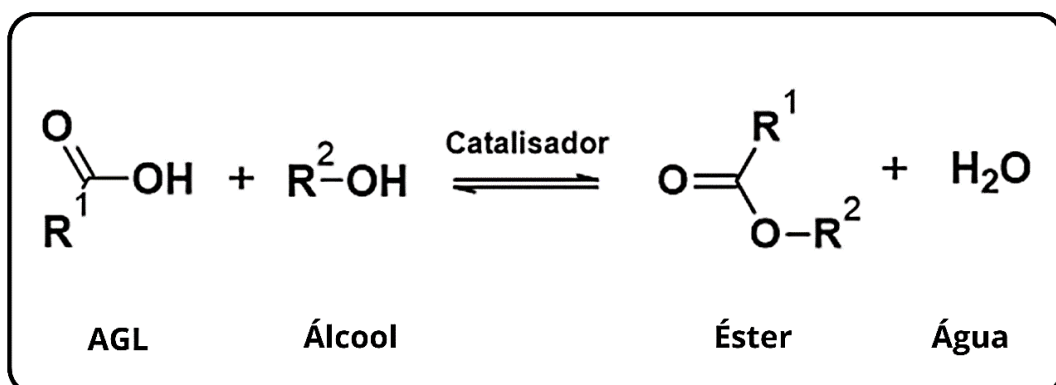
Figura 4 - Representação geral da reação de hidrólise de triacilgliceróis catalisada por lipases.



Fonte: Do autor.

A aplicação de enzimas comparado aos métodos convencionais, apresenta a vantagem de ser realizado sob condições amenas de pressão e temperatura, viabilizando a redução de custos relacionados a energia e aos equipamentos. Ademais, há também uma redução nos procedimentos de tratamento de resíduos associados a esse método (Tavares *et al.*, 2021). Os AGLs, produzidos pela hidrólise enzimática de óleos, são empregados como matéria-prima em uma ampla gama de aplicações nos processos industriais, como na produção de oleoquímicos, aminas, álcoois e ésteres (Souza *et al.*, 2020). A reação de esterificação trata-se de um processo de obtenção de ésteres a partir de AGL e um álcool de interesse, no qual se têm a formação de água como subproduto, podendo este ser catalisado por bases, ácidos ou enzimas (Figura 5) (Kim *et al.*, 2004).

Figura 5 - Representação da reação de esterificação.



Fonte: Do autor.

A esterificação enzimática é um processo que engloba vários fatores importantes. A reação é controlada termodinamicamente e as lipases podem ser inibidas ou inativadas por reagentes, produtos ou variações de temperatura. Assim, a quantidade de água é um dos fatores que controla a reação de esterificação. Quando em excesso, pode ocorrer um deslocamento do equilíbrio químico e favorecer a hidrólise dos ésteres. Contudo, é necessária uma certa quantidade de água no meio (denominada água de hidratação) para manter a estrutura tridimensional da lipase (Fu; Vasudevan, 2009; Sousa *et al.*, 2021). O principal desafio na utilização de lipases imobilizadas para reações de esterificação é o acúmulo de água no interior do biocatalisador. Uma estratégia viável para superar esse problema é utilização de suportes hidrofóbicos, evitando a adsorção de água no biocatalisador, assim como as limitações difusionais para substratos hidrofóbicos (Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020; (Molina-Gutiérrez *et al.*, 2021).

3.5 MACAÚBA: UMA PROPOSTA DE SUPORTE NA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES

A biocatálise heterogênea é um aspecto muito importante da Grande Biotecnologia, o qual possui interesse científico significativo e potencial prático para aplicações industriais, sobretudo na conversão de matérias-primas renováveis em produtos de alto valor agregado (Kovalenko; Perminova; Beklemishev, 2021). A seleção do suporte a ser utilizado depende principalmente da natureza da enzima em questão, do método de imobilização e da aplicação industrial final. Contudo, algumas características essenciais devem ser consideradas para suportes enzimáticos, tais como: sua disponibilidade, estabilidade, biodegradabilidade, baixo custo, ausência de toxicidade, estrutura altamente porosa, elevada área superficial, compatibilidade enzimática e possibilidade de sofrer modificações químicas (Costa-Silva *et al.*, 2021).

Grandes quantidades de resíduos agroindustriais são geradas a partir de atividades de produção primária. A biomassa lignocelulósica é caracterizada como o recurso biológico mais abundantemente disponível, o qual possui um rendimento global de até 1,3 bilhões de toneladas por ano (Nájera-Martínez *et al.*, 2022). Esses resíduos são gerados principalmente pela indústria agrícola ou pelos resíduos domésticos. Infelizmente, a eliminação inadequada desses resíduos é um grande

problema e grande parte da biomassa lignocelulósica é frequentemente eliminada por meio da queima. Este procedimento pode gerar amônia, metano e dióxido de carbono, ambos contribuindo com o efeito estufa, o que acarreta sérios problemas de poluição ambiental. Recentemente, as biomassas lignocelulósicas ganharam um crescente interesse de pesquisa, em especial à sua natureza renovável. Portanto, as imensas quantidades desses resíduos possuem o potencial de serem convertidas em diversos produtos de alto valor, incluindo biocombustíveis, produtos químicos de alto valor agregado e fontes de energia acessíveis para uso em processos de fermentação microbiana, produção de enzimas e como suporte enzimático (Costa-Silva *et al.*, 2021; Girelli; Astolfi; Scuto, 2020; Nájera-Martínez *et al.*, 2022).

A macaúba (*Acrocomia aculeata*) é uma palmeira tropical da família Arecaceae, nativa da América do Sul. Esta palmeira tem sido considerada uma cultura energética promissora devido ao seu alto potencial na produção de bioenergia a partir de seus frutos, bem como à possibilidade de integração em sistemas agrícolas envolvendo lavoura-pecuária e floresta-agro (Rencoret *et al.*, 2018). No Brasil, as macaúbas são mais abundantes nas regiões Sudeste e Centro-Oeste, e desempenham funções ecológicas vitais, especialmente na restauração de áreas degradadas e no sequestro de carbono. Notavelmente, para fins industriais, apenas os frutos precisam ser colhidos, permitindo assim que o carbono permaneça armazenado nas estruturas vegetativas (raízes, caules e folhas). Isto diferencia a macaúba de outras culturas arbóreas utilizadas para bioenergia, as quais exigem frequentemente a remoção ou corte das estruturas vegetativas, liberando assim o carbono armazenado (Moreira *et al.*, 2020). O fruto da macaúba possui um alto teor de óleo, o que o torna favorável para a produção de biodiesel. Essas frutas, de alto teor oleaginoso, possuem aplicações em vários setores industriais, incluindo alimentos, cosméticos, produtos de higiene pessoal e fontes de bioenergia, como biodiesel e bioquerosene (Da Costa Lima Pires *et al.*, 2023; Rencoret *et al.*, 2018).

O fruto da macaúba é uma drupa comestível, medindo cerca de 3,0 a 5,0 cm de diâmetro e possui formato globoso. Ele possui um mesocarpo fibroso mucilaginoso de coloração variada e sabor adocicado. O endocarpo está aderido fortemente ao mesocarpo, e a semente possui um grande endosperma, que pode ter até quatro sementes por fruto. Quando maduro, o fruto possui aroma característico e a sua casca separa-se facilmente da polpa. Os frutos da macaúba são compostos

aproximadamente por 20% de casca, 40% de polpa, 33% de endocarpo e 7% de caroço (Mittaine, 2018). Do ponto de vista do consumo humano, os frutos da macaúba fornecem quantidades significativas de lipídios, fibras, minerais e proteínas de alta qualidade. Estes frutos produzem dois tipos de óleo: um extraído da polpa e outro do caroço. O óleo derivado da polpa é rico em ácidos graxos monoinsaturados, principalmente ácido oleico, enquanto o óleo extraído da amêndoa é caracterizado por ácidos graxos saturados, principalmente ácido láurico. Além disso, existem variações na composição e proporção de triglicerídeos, diglicerídeos, ácidos graxos livres e compostos em menor escala (Da Costa Lima Pires *et al.*, 2023).

A cada quilograma do fruto de macaúba submetida à extração de óleo (hidráulica), são gerados cerca 500 gramas de biomassa residual. Nesta biomassa, estão incluídos as fibras, lipídios e proteínas, o qual também podem ser utilizados como uma alimentação alternativa para animais. Ademais, a torta de macaúba resultante do processo tem sido empregada tanto na alimentação de animais ruminantes quanto não ruminantes. O carbono proveniente do endocarpo possui densidade aparente de 1,29 (g/cm³) e um poder calorífico de 8.045,56 (kcal/kg), devido a sua elevada concentração de lignina (Colombo *et al.*, 2017). Este subproduto de carbono é empregado em diversas áreas, incluindo siderurgia, metalurgia, artesanato e na produção de carvão ativado (Da Costa Lima Pires *et al.*, 2023). Considerando a quantidade de resíduo resultante do processo extrativo do óleo, a macaúba é uma alternativa viável e sustentável para a utilização dos seus resíduos como potenciais suportes para imobilização enzimática.

Para serem suportes eficientes, os suportes devem apresentar boas propriedades mecânicas, assim como tamanho adequado de partículas e poros. Suas propriedades mecânicas devem ser compatíveis com o reator de trabalho, sendo capazes de resistir à pressão e ao estresse mecânico causado pela agitação (Nájera-Martínez *et al.*, 2022). O tamanho das partículas desempenha um papel fundamental para a recuperação do biocatalisador e no seu manuseio em ambiente industrial, além de influenciar a área superficial disponível para interação com a enzima. Partículas grandes podem levar a problemas de difusão, por isso, é importante considerar as condições ideais para cada enzima. Para a imobilização de lipases, por exemplo, é preferível um tamanho de partícula maior, a fim de melhorar a interação entre a interface água/óleo. O tamanho dos poros do suporte também é um importante onde

a capacidade de carga do suporte é diretamente afetada pela quantidade de enzima que pode entrar nos poros. Logo, quanto maior a capacidade de carga de um suporte, melhor será o desempenho do biocatalisador (De *et al.*, 2015; Nájera-Martínez *et al.*, 2022; Rencoret *et al.*, 2018)

Cada resíduo lignocelulósico possui sua própria composição, entretanto, de modo geral, a biomassa lignocelulósica é formada principalmente por 35-45% de celulose, 20-30% de hemicelulose, 10-30% de lignina e pequenas quantidades de extrativos e proteínas (Nájera-Martínez *et al.*, 2022). A celulose, um polímero composto de monômeros de glicose, e a hemicelulose, um polímero de pentoses e hexoses, representam os principais elementos estruturais presentes nas paredes celulares das plantas, desempenhando um papel fundamental na resistência mecânica destas estruturas. Já a lignina que contém três álcoois aromáticos (álcool coniferílico, álcool sinapílico e álcool p-cumarílico) atua como um selo protetor em torno dos outros dois componentes (Girelli; Astolfi; Scuto, 2020). Para explorar um potencial desenvolvimento de biocatalisadores a partir de resíduos agroindustriais, como fibras de coco, palha de arroz, restos de milho e grãos de cerveja, a realização de pré-tratamentos se torna crucial (Liu, Shan *et al.*, 2019; Nájera-Martínez *et al.*, 2022).

Os pré-tratamentos visam desestruturar as fortes ligações presentes nas paredes celulares vegetais, viabilizando uma maior superfície de interação das enzimas na matriz vegetal (Liu, Shan *et al.*, 2019; Nájera-Martínez *et al.*, 2022). Os pré-tratamentos físicos são realizados a fim de reduzir o tamanho de partícula, lavagem e esterilização simples, empregando temperaturas e pressões elevadas para a remoção impurezas. Por outro lado, os tratamentos químicos envolvem o uso de reagentes como hidróxido de sódio, ácido sulfúrico, ácido clorídrico, peróxido de hidrogênio, entre outros. O tratamento com ácido clorídrico (HCl) é geralmente utilizado para ativar a superfície do suporte, removendo a cera e degradando a hemicelulose. Efetivamente, a utilização destes tratamentos torna o suporte mais poroso e aumenta a sua área superficial, o qual estabelece um ambiente propício para otimizar o processo de imobilização (Rodríguez-Restrepo; Orrego, 2020).

Sendo assim, o estudo tem como finalidade avaliar o potencial da utilização de partículas do epicarpo do fruto da macaúba como suporte para a imobilização de lipase via adsorção física, para posterior utilização na produção de ésteres de

solketila. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram a eficiência do catalisador heterogêneo, em reações de esterificação para a obtenção de ésteres de solketila com um excelente rendimento, utilizando matérias-primas renováveis e de baixo custo. Desta forma, esta metodologia contribui para o progresso de investigações direcionadas ao estudo da viabilidade da utilização de resíduos provenientes da agroindústria na síntese de compostos de valor agregado com uma ampla gama de aplicações.

4 ARTIGO 1

Biocatalytic production of solketal esters from used oil utilizing treated Macauba epicarp particles as lipase immobilization support: a dual valorization of wastes for a sustainable chemistry

José Miguel Jr.^{1,2}, João V. B. Dimas², Milson S. Barbosa³, Raphael A. B. Gomes⁴, Ana K. F. Carvalho⁵, Cleide M. F. Soares^{6,7}, Roberto Fernandez-Lafuente⁸, Adriano A. Mendes^{1,2*}

¹Graduate Program in Biotechnology, Federal University of Alfenas, Alfenas 37130-001, MG, Brazil

²Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, Alfenas 37130-001, MG, Brazil

³Federal Institute of Education, Science and Technology of Paraíba – Campus Cajazeiras, Cajazeiras 58900-000, PB, Brazil

⁴School of Nutrition, Federal University of Ouro Preto, Ouro Preto 35400-000, MG, Brazil

⁵Department of Basic and Environmental Sciences, Engineering School of Lorena, University of São Paulo, Lorena 12602-810, SP, Brazil

⁶Tiradentes University, Aracaju 49032-490, SE, Brazil

⁷Institute of Technology and Research, Aracaju 49032-490, SE, Brazil

⁸Departamento de Biocatálisis, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICP-CSIC), Campus UAM-CSIC, 28049 Madrid, Spain

* Corresponding author at: Institute of Chemistry, Federal University of Alfenas, 37130-001, Tel: +55 35 3701 9711, Alfenas, MG, Brazil

Email address: adriano.mendes@unifal-mg.edu.br (A.A. Mendes)

Orcid: <https://orcid.org/0000-0001-7698-8439>

ABSTRACT

This study describes the enzymatic production of solketal esters from used soybean cooking oil (USCO) by hydroesterification. This process comprises a complete hydrolysis of USCO into free fatty acids (FFAs) catalyzed by a non-specific lipase extract from *Candida rugosa* (CRL). The resulting FFAs were used as raw material for esters production by esterification with solketal in a solvent-free system. For such a purpose, a low-cost lipase (Eversa® Transform 2.0 – ET2.0) was immobilized via physical adsorption on treated epicarp particles from *Acrocomia aculeata* (macauba), a lignocellulosic biomass waste. A protein loading of $25.2 \pm 1.3 \text{ mg.g}^{-1}$ of support and immobilization yield of $64.8 \pm 2.5\%$ was achieved by offering 40 mg of protein/g of support. The esterification reaction was optimized by a central composite rotatable design (CCRD) achieving a FFAs conversion of $72.5 \pm 0.8\%$ after 150 min of reaction at 46 °C using a biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ and FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6. The biocatalyst retained 70% of its original activity after ten esterification batches. This paper shows the conversion of two agro-industrial wastes into valuable materials (enzyme immobilization support and solketal esters).

Keywords: Solketal esters, Hydroesterification, Lipase, Agro-industrial wastes, Valorization.

1. Introduction

Solketal (DL-1,2–isopropylidenglycerol or 2,2-dimethyl-1,3-dioxolane-4-methanol) is a valuable chiral compound produced by the acetalization of glycerol, a byproduct from the biodiesel production (Olson *et al.*, 2023), with acetone (Olson *et al.*, 2023; Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2018). It has been extensively utilized as a fuel additive by blending it with gasoline or biodiesel and it is also a pharmaceutical intermediate (Talebian-Kiakalaieh *et al.*, 2018). It has also been used in cosmetics and personal care products, food and beverage industry, pharmaceutical industry, paints and coatings, and chemical manufacturing (Data Bridge Market Research, 2020). One of its main application consists in the production of esters from a wide range of carboxylic acids (Barbosa *et al.*, 2019; Data Bridge Market Research, 2020; Lee *et al.*,

2023; Mariam *et al.*, 2022; Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020; Villa *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2014). These synthetic solketal esters are used as dietary supplements (Villa *et al.*, 2020), antimicrobial agents (Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020), oxygenated fuel additives (Barbosa *et al.*, 2019; Mariam *et al.*, 2022), plasticizing agents (Lee *et al.*, 2023), and monomers for polyurethane production (Yang *et al.*, 2014).

Solketal esters are conventionally produced by esterification and/or transesterification reactions catalyzed by acid or basic homogeneous catalysts such as sodium methoxide (Kenar and Knothe, 2008), potassium methoxide (Neamtu *et al.*, 2019), sodium carbonate (Mariam *et al.*, 2022), *p*-toluenesulfonic acid (Perosa *et al.*, 2016; Yang *et al.*, 2014), or a mixture of triphenylphosphine/iodine/imidazole (Sultanova *et al.*, 2023). Moreover, amorphous sulfonated silica (Barbosa *et al.*, 2019) and oxides derived from calcium-rich natural materials (Sankaranarayanan *et al.*, 2017) have also been utilized as acid or basic heterogeneous catalysts of this esterification reaction, respectively. In general, these reaction systems require the utilization of high temperatures – from 90 to 150 °C (Barbosa *et al.*, 2019; Kenar and Knothe, 2008; Mariam *et al.*, 2022; Neamtu *et al.*, 2019; Yang *et al.*, 2014). Moreover, complex reaction schemes using high amounts of hazardous organic solvents or ionic liquids to improve the miscibility of the raw materials are required. Additionally, these studies require inert atmospheres using dry nitrogen to avoid undesirable byproducts formation, caused by different reactions such as oxidation, polymerization and other ones, in order to produce solketal esters with high yields and purities (Barbosa *et al.*, 2019; Kenar and Knothe, 2008; Neamtu *et al.*, 2019; Sultanova *et al.*, 2023).

In this context, the enzymatic production of these compounds using lipases poses great interest and, therefore, it has been extensively studied due to the advantages of biocatalysis over traditional chemical routes such as milder experimental conditions, which reduce energy demand, and their high specificity, enantioselectivity and mainly, selectivity, which reduces the formation of undesirable byproducts that, thus, minimizes the generation of wastes and simplify the purification steps (Sousa *et al.*, 2021; Stergiou *et al.*, 2013).

Lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) are a class of enzymes that catalyzes the hydrolysis of triacylglycerols to glycerol and free fatty acids (FFAs) (Schmid and Verger, 1998; Verger, 1997). They have been utilized as biocatalysts in solketal esters production in their free forms (lyophilized crude extracts (Mine *et al.*, 2005; Zniszczol and Walczak, 2014), and also as whole cells – lyophilized mold

mycelia (Da Silva Junior *et al.*, 2020; Romano *et al.*, 2006; Torregrosa *et al.*, 2016)), and immobilized mycelia or lipases on different support materials (Boncel *et al.*, 2013; Itabaiana *et al.*, 2014; Johny *et al.*, 2019; Junior *et al.*, 2012; Lozano *et al.*, 2016; Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020; Rocha *et al.*, 2020; Villa *et al.*, 2020). These studies have also been preferentially conducted in solvent systems by using hazardous classical organic solvents (Boncel *et al.*, 2013; Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020; Mine *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2020; Romano *et al.*, 2006), ionic liquids (Lozano *et al.*, 2016) or supercritical CO₂ (Villa *et al.*, 2020). In a previous study performed in our group, a saturated solketal ester was produced via enzymatic esterification conducted in a solvent system (heptane) utilizing commercial palmitic acid as raw material (Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020). However, the use of solvent-free reaction systems in the enzymatic production of several chemicals, including solketal esters, has attracted great attention in order to establish environmental-friendly processes of industrial interest by avoiding the use of any additional organic solvent, although these systems have their own drawbacks (Sousa *et al.*, 2021).

In this context, the main objective of this study was to develop a sustainable process for the production of solketal esters from waste oils, e.g. used soybean cooking oil (USCO), by a two-step enzymatic process known as hydroesterification. The first step consisted in the complete hydrolysis of USCO, that we have intended to be performed in an emulsifier-free and buffer-free system (that way, simplifying the purification steps) catalyzed by a non-specific lipase from *Candida rugosa* – CRL (de María *et al.*, 2006). Subsequently, the resulting FFAs were separated from the reaction mixture, eliminating the glycerin that can interfere in the next step of the process, and esterified with solketal in a solvent-free system catalyzed by lipase Eversa® Transform 2.0 (ET2.0). In this reaction, a ET2.0 heterogeneous biocatalyst was prepared by immobilization of the enzyme via physical adsorption (Bolivar *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2019) in an ecological support. This was the second objective of this research, treated *Acrocomia aculeata* (macauba) epicarp particles were utilized as support for the lipase immobilization. Macauba (Figure 1) stands out as a native palm tree of tropical forests and savannahs in Central and South America with an oil (pulp and kernel oils) productivity above 6 ton per hectare (Ampese *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2017; Evaristo *et al.*, 2016; Lopes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016).



Figure 1. Representation of macauba palm tree (A), palm tree with fruit bunches (B), fruits (C), and treated macauba epicarp particles (D).

This oleaginous plant has been considered a highly promising oil producer useful for the production of biodiesel and biokerosene for aviation (Lopes *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2016). However, its processing generates a large amount of wastes. Therefore, recent studies have intensified the search for the utilization of these wastes via different protocols such as thermal conversion, pyrolysis, combustion and fermentative processes (Ampese *et al.*, 2021; Cardoso *et al.*, 2017). Macauba epicarp, that corresponds to around 23% of dry weight of the fruit (Evaristo *et al.*, 2016), can also be utilized in the production of briquettes due to its high energy density (Costa *et al.*, 2019). The utilization of low-cost biomass-based materials with suitable properties from lignocellulosic wastes has been extensively studied in recent years (Bijoy *et al.*, 2022; Girelli *et al.*, 2020; Girelli and Chiappini, 2023). However, the use of macauba epicarp as a renewable and eco-friendly support to immobilize lipases has not been reported in the literature yet. In general, these materials require pre-treatment steps for the development of appropriate particles features: size, specific surface, pore diameters and introduction of functional groups to provide stable and active biocatalysts with high enzyme retention capacity (Bijoy *et al.*, 2022).

This study can be a promising strategy to mitigate the deleterious and hazardous effects of the improper disposal of waste cooking oils to the environment that causes damages to plants, animals and marine life (Foo *et al.*, 2021; Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.*, 2022). Therefore, the production of valuable chemicals by recycling waste cooking oils can offer several benefits such as economic, social, environmental, and waste management. Moreover, we intend to transform an agro-industrial waste (macauba epicarp), that nowadays is mainly disposed in Nature, into a valuable lipase immobilization support. This study also intends to expand the potential application of Eversa[®] Transform 2.0 (ET2.0), a low-cost commercial soluble lipase derived from the lipase from *Thermomyces lanuginosus* and industrially produced from genetically modified *Aspergillus oryzae*. This enzyme is broadly used in industrial biodiesel production (Kim *et al.*, 2023; Monteiro *et al.*, 2021). This is an original study that consists in the utilization of treated macauba epicarp particles as lipase support material and solketal esters production using ET2.0 as potential biocatalyst.

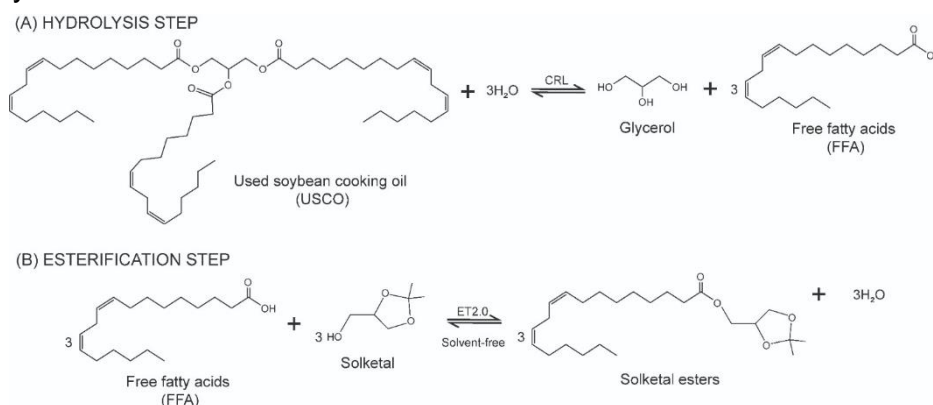


Figure 2. Illustrative scheme of the enzymatic production of solketal esters from USCO via hydroesterification process.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Macauba fruits were manually harvested from the Cerrado biome at the Federal University of São João del-Rei, Campus Sete Lagoas – latitude: 19°28'32.18"S; longitude: 44°11'44.808"W (Sete Lagoas, MG, Brazil). Lipase Eversa[®] Transform 2.0 – ET2.0 (liquid extract, hydrolytic activity of 19,856.7 units mL⁻¹ and protein concentration of 33 mg.mL⁻¹), lipase from *Candida rugosa* – CRL (powder extract, hydrolytic activity of 16,156.8 units/g and protein content of 24.5 mg.g⁻¹) and solketal

were acquired from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA). USCO was collected after being used once for french fries preparation in a restaurant at the Federal University of Alfenas (Alfenas, MG, Brazil). Its fatty acid composition and properties were described in a recent study (Sabi *et al.*, 2022). All other chemicals and solvents were of analytical grade acquired from Synth[®] (São Paulo, SP, Brazil).

2.2. Preparation of macauba epicarp particles

Macauba fruits were firstly washed with distilled water to remove impurities and dried for 15 h in an oven at 60 °C to facilitate epicarp removal. Then, the epicarp was separated, crushed in a knife-mill and the particles with a size of 75 to 120 µm were selected using vibratory sieves. Subsequently, 30 g of the material were refluxed with 400 mL of 3.5% m.m⁻¹ HCl solution at 120 °C by 2 h (Zhang *et al.*, 2017). This experimental procedure was conducted twice. The treated particles were collected by filtration in a Buchner funnel under vacuum using Whatman n° 41 filter paper, washed with deionized water and dried for 15 h in an oven at 60 °C before its use. Then, the support material was transferred to a 500 mL closed flask with 200 mL 70% m.m⁻¹ ethanol solution and immersed in a temperature-controlled water-bath under continuous orbital stirring (200 rpm) at 25 ± 1 °C by 15 h. This procedure was also performed twice. Finally, the treated material was collected by filtration in a Buchner funnel under vacuum using Whatman n° 41 filter paper and dried for 15 h in an oven at 60 °C before use. The process flow chart for the preparation of treated macauba epicarp particles (material support) and the average mass loss after each step of the proposed process is illustrated in Figure 6.

2.3. Support characterization

The morphology of untreated and treated macauba epicarp particles was determined by scanning electron microscopy (SEM) in a Quanta 200 FEI equipment under vacuum operating at 5 kV. The scanning was performed at magnification of 53× and 20000× for untreated support and 20000× for treated support. These materials were also analyzed by Fourier transform infrared (FT-IR) spectrometry using a Nicolet iS50 FT-IR – Thermo Scientific spectrophotometer (Madison, WI, USA). The samples were scanned between 3600 and 500 cm⁻¹ at a spectral resolution of 4 cm⁻¹. X-ray diffraction (XRD) data were collected on Empyrean Panalytical diffractometer using

CuK α radiation ($\lambda=1.5418\text{\AA}$) in the range of 2θ of $5^\circ\text{--}50^\circ$.

2.4. General immobilization procedure of ET2.0 on treated macauba epicarp particles

The immobilization of ET2.0 on treated macauba epicarp particles was conducted according to the methodology reported in previous studies (Alves *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2019). The immobilization process consisted of the preparation of a suspension by adding 10 g of the support to 190 mL of a lipase solution prepared with 12.1 mL of crude lipase solution and 178 mL of 5 mmol.L^{-1} sodium acetate solution pH 5.0 that corresponds to an initial protein loading of 40 mg.g^{-1} of support. The resulting suspensions were added to 300 mL closed flasks and immersed in a temperature-controlled water-bath under continuous orbital stirring (200 rpm) at $25 \pm 1^\circ\text{C}$ for 15 h. The immobilized biocatalysts were recovered via filtration in a Buchner funnel under vacuum using Whatman n $^\circ$ 41 filter paper and thoroughly washed with distilled water to remove unbounded lipase molecules. The adsorption process was monitored by measuring the residual protein concentration (Bradford, 1976), and hydrolytic activity units (Alves *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2019) in the supernatant solution. The heterogeneous biocatalysts were stored at 4°C for 24 h prior to use. The hydrolytic activity of ET2.0 was assessed according to the olive oil emulsion hydrolysis method (Alves *et al.*, 2017; Machado *et al.*, 2019). One international unit (U) of activity was defined as being the mass of biocatalyst necessary to produce $1\text{ }\mu\text{mol}$ of FFAs per min at pH 8.0 (100 mmol.L^{-1} buffer sodium phosphate), 37°C , and 200 rpm.

Immobilization yield percentage (IY) was calculated as shown in Eq. (1) (Boudrant *et al.*, 2020).

$$\text{IY} = \left(\frac{\text{EA}_0 - \text{EA}_f}{\text{EA}_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

where EA_0 and EA_f are the initial and residual enzymatic activity in the supernatant immobilization (U.mL^{-1}), respectively.

Immobilized protein loading (IP – mg.g^{-1} of support) at equilibrium was calculated as follows – Eq. (2):

$$\text{IP} = \frac{V_{\text{enz}} \times (C_0 - C_f)}{m} \quad (2)$$

where V_{enz} is the volume of enzyme solution (mL); C_0 and C_f are respectively the initial and residual protein concentration in the immobilization supernatant ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); and m is the mass of support (g).

2.5. Enzymatic hydroesterification of USCO

The production of FFAs via hydrolysis of USCO catalyzed by a non-specific lipase (lyophilized CRL extract) in the absence of emulsifier and buffer agents was conducted according to the methodology described in previous reports (Carvalho *et al.*, 2021; Guedes Júnior *et al.*, 2022; Sabi *et al.*, 2022). The reaction system was prepared by mixing 20 g of waste oil and 30 g of distilled water in a closed reactor (350 mL polypropylene flask) immersed in a temperature-controlled water-bath under continuous mechanical stirring (1500 rpm) at 40 ± 1 °C. The reaction was started by adding 50 units of hydrolytic activity of CRL per g of reaction mixture that corresponds to 3.2 g powder CRL extract per Kg of reaction mixture. Under such experimental conditions, a hydrolysis percentage above 98% was achieved after 3 h of reaction (Sabi *et al.*, 2022). The resulting FFAs were then recovered in a separation funnel, followed by washing with distilled water at 60 °C and dehydrated by adding anhydrous sodium sulfate to be used as raw material in esterification reaction.

The esterification of FFAs and solketal was performed in 100 mL open glass bottles (height to diameter ratio of 2) containing 6 g of raw materials and appropriate amounts of the immobilized lipase prepared using high protein loading ($40 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ of support). The reaction mixtures were immersed in a temperature-controlled water-bath under fixed continuous orbital stirring (240 rpm). At regular intervals, 50 μL aliquots from the reaction mixture were taken and suspended in 10 mL 95% $\text{m}\cdot\text{m}^{-1}$ ethanol solution. The resulting solution was strongly stirred and titrated with $30 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOH solution using phenolphthalein as indicator to calculate FFAs conversion percentage (Y), as shown in Eq. (5) (Machado *et al.*, 2019; Sabi *et al.*, 2022; Sarno *et al.*, 2019). In this set of experiments, all reactions were performed with two replicates and the experimental values are represented as mean \pm s.d. Control assays were performed using only macauba epicarp particles and no FFAs consumption was detected under such conditions.

$$Y(\%) = \left(\frac{FFAs_0 - FFAs_t}{FFAs_0} \right) \times 100 \quad (5)$$

where $FFAs_0$ is the initial concentration (mol.L^{-1}), and $FFAs_t$ is the residual concentration after a certain time t (mol.L^{-1}).

The scheme of sequential enzymatic hydrolysis of trilinolein, the most abundant triacylglycerol presents in soybean oil (Li *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2011), and esterification of the resulting FFAs with solketal in a solvent-free system is shown in Figure 2.

2.6. CCRD optimization of solketal esters production via esterification reaction

A full CCRD with three independent variables such as FFAs:solketal molar ratio (from 1:1 to 1:4), reaction temperature (from 40 to 70 °C) and biocatalyst concentration (from 5 to 20% m.m^{-1}) was proposed to optimize the enzymatic production of solketal esters. The levels of each independent variable were based on previous studies performed in our research group (Carvalho *et al.*, 2021; Guedes Júnior *et al.*, 2022; Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020). The statistical approach consisted of eighteen runs – eight factorial points, six axial points and four center points. The reactions were performed in a random order to reduce possible systematic errors using fixed initial mass of raw materials (6 g), continuous orbital stirring (240 rpm), and reaction time (40 min). The dependent variable (response) was FFAs conversion percentage. The experimental data were analyzed at 95% confidence level using software Protimiza Experimental Design (<https://experimental-design.protimiza.com.br>) to obtain 3D response surface and contour plots. The relation between coded independent variables and their interactions and response was described by a quadratic polynomial equation (Eq. (6)). In this study, the empirical model was developed considering only with the statistically significant parameters (p -value < 0.05).

$$Y(\%) = a_0 + \sum_{i=1}^n a_i x_i + \sum_{i=1}^n a_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n a_{ij} x_i x_j + e \quad (6)$$

where Y is the predicted FFAs conversion percentage; n is the number of independent variables (3), x_i and x_j are 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 index numbers of each independent variable and e is random error.

The effects of the main variables and their interactions were estimated by variance analysis (ANOVA). The adequacy of the quadratic model was evaluated by the coefficient of determination (R^2), probability (p -value), lack of fit and Fischer's " F " test. 3D response surface and contour plots were used to determine the optimal experimental conditions. The experimental model was validated by performing solketal esters production under the conditions predicted by the quadratic model. The experimental results were compared with predicted values according to Eq. (6).

2.7. Effect of reaction time on enzymatic solketal esters production

The effect of reaction time on solketal esters production was conducted under the optimal conditions obtained from the analysis of 3D response surface and contour plots (FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6, 46 °C and biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ that corresponds to an immobilized protein concentration of 5.05 mg.g⁻¹ of reaction mixture).

2.8. Operational stability tests of the immobilized ET.2.0

These tests were conducted under optimal experimental conditions (FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6, 46 °C and biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹) after 150 min of reaction (time required to achieve maximum FFAs conversion percentage). At the end of each esterification batch, the heterogeneous biocatalyst was recovered from the reaction mixture via filtration in a Buchner funnel under vacuum, and washed with cold hexane to remove any compound retained on its surface. The biocatalyst was stored overnight at 4 °C under static conditions. Finally, the recovered biocatalyst was resuspended in a fresh reaction mixture to start a new esterification batch.

2.9. Separation of the esters

Firstly, the heterogeneous biocatalyst was recovered from the reaction mixture via filtration in a Buchner funnel under vacuum. The resulting reaction mixture was then transferred to a 500 mL separation funnel, followed by adding 200 mL distilled water at 60 °C. The bottom phase (washing water) was eliminated and the upper phase was

three-times washed following this protocol. Finally, 20% m.m⁻¹ anhydrous sodium sulfate, dried in a muffle furnace at 250 °C for 24 h, was added to the esters and kept overnight under static conditions at 25 °C to remove water traces.

2.10. Identification by FT-IR and NMR analyses

FT-IR spectra for raw materials (FFAs and solketal) and product (solketal esters) were recorded on a Spectrum GX FT-IR spectrometer (Perkin Elmer, USA). These spectra were acquired after 32 scans between 4000 and 400 cm⁻¹ with spectral resolution of 4 cm⁻¹ using KBr as a matrix. ¹H (300 MHz) and ¹³C (75 MHz) nuclear magnetic resonance (NMR) spectra of solketal esters were recorded on a Bruker AC 300 equipment (Bruker BioSpin, Germany). The signals of deuterated water (solvent) and tetramethylsilane (internal standard) were suppressed from the spectra.

3. Results and discussion

3.1. *Macauba epicarp particles characterization*

In this study, preliminary tests were conducted by using untreated macauba epicarp particles as a support material to immobilize ET2.0. However, a very low amount of adsorbed enzyme ($IP \leq 5 \text{ mg}_{\text{protein}} \cdot \text{g}^{-1}$ of support) by offering a high lipase loading (40 mg.g⁻¹ of support) was obtained due to release of components (extractives) of this material in the immobilization supernatant that resulted in a strong turbidity (milky appearance). Therefore, the use of macauba epicarp particles as a lipase immobilization support requires efficient pre-treatment technologies to remove extractives, hemicellulose and/or lignin fractions to provide a material with better features (Bijoy *et al.*, 2022; Girelli and Chiappini, 2023). A series of pre-treatment methods based on recent reports was proposed such as acid pre-treatment and solvent extraction processes (Mankar *et al.*, 2021; Parchami *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2022). In this study, the influence of pre-treatment techniques on the properties of macauba epicarp particles was evaluated by FT-IR, XRD and SEM analyses and compared with its untreated form.

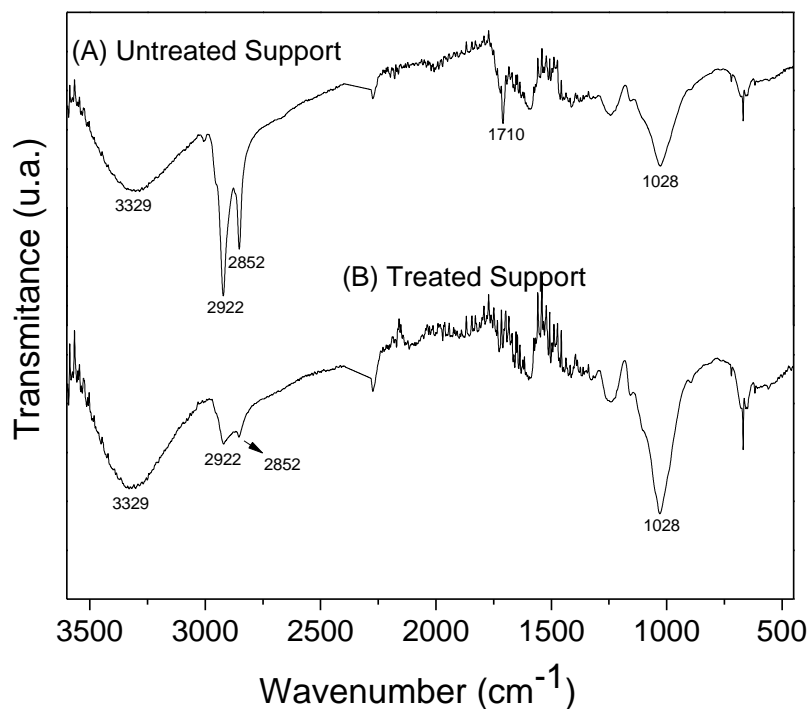


Figure 3. FT-IR spectra of untreated (A) and treated (B) macauba epicarp particles.

FT-IR analysis was conducted to identify changes in functional groups of untreated and treated macauba epicarp particles within the interval of 3600–500 cm^{-1} . According to Figure 3, both untreated and treated samples exhibited a broad band at 3329 cm^{-1} related to O–H stretching vibrations that corresponds to the presence of alcoholic and phenolic hydroxyl groups in their structures. On the other hand, a sharp decrease of intensity of the band between 2922 cm^{-1} and 2852 cm^{-1} assigned to stretching vibration of C–H bonds of methyl and methylene groups and the disappearance of the band associated with the stretching vibration of C=O bond at 1710 cm^{-1} of carbonyl groups after treatment processes can be observed. This disappearance of this characteristic band suggests possible cleavage in acetyl and uronic esters, and/or ester bonds of ferulic and *p*-coumaric acids existent in the structure of lignocellulosic materials (Chawla and Goyal, 2023). These results indicate partial removal of hemicellulose and lignin fractions during the treatment process (Du *et al.*, 2016). Moreover, an increase in the intensity of the characteristic band at 1028 cm^{-1} related to C–OH stretching vibration was also observed, which suggests an increase of percentage of cellulose content in the chemical composition of treated

support material (Du *et al.*, 2016; Qureshi *et al.*, 2023). These results confirm changes in the chemical composition of macauba epicarp after the treatment processes.

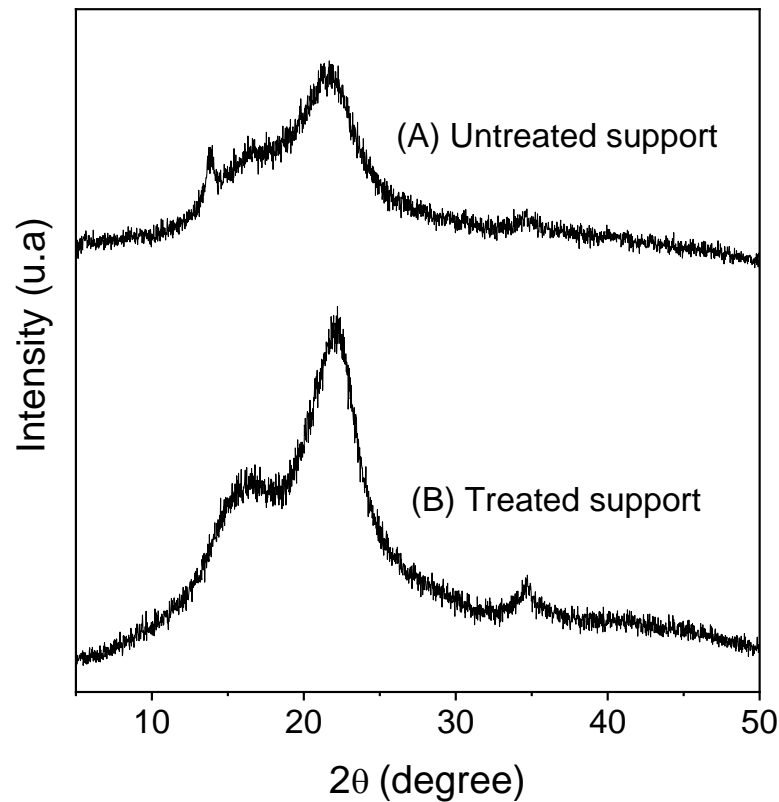


Figure 4. X-ray patterns of untreated (A) and treated (B) macauba epicarp particles.

The X-ray diffraction patterns for untreated and treated macauba epicarp particles are illustrated in Figure 4. A sharp typical peak for untreated support material at 2θ values between 16 and 25° , which is characteristic of crystalline cellulose, was observed. After treatment process, an increase in the intensity of this peak, with concomitant appearance of a peak at 2θ value around of 34° , was detected. This X-ray diffractogram reveals loss of amorphous components such as lignin, hemicellulose and extractive fractions after sequential treatment process (Du *et al.*, 2016; Kim *et al.*, 2016), which corroborates with FT-IR analysis.

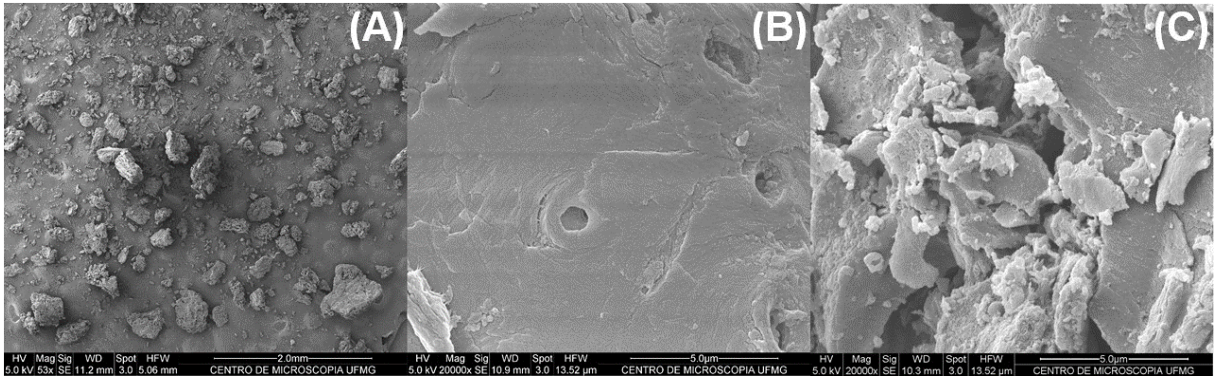


Figure 5. SEM images of untreated – magnification of 53x (A) and 20000x (B), and treated – magnification of 20000x (C) macauba epicarp particles.

SEM analysis was performed in order to know the changes in the morphology of the macauba epicarp particles after the treatment process (Figure 5). Untreated macauba epicarp particles have an irregular structure (Figure 5(A)) and a smooth and highly ordered surface structure that confirms its non-porous structure (Figure 5(B)), and, thus, low capacity to adsorb ET2.0. After the treatment process, the material presented a porous structure that resulted in exposure of its internal surface (Figure 5(C)). These images show that the rigid structure of native material was disarranged due to cleavage and/or partial removal of hemicellulose and/or lignin fractions and extractives, in accordance with FT-IR and XRD analyses. Moreover, the mass balance shown in Figure 6 shows also that a mass loss of around 54% (from 19.1 ± 0.7 g to 8.88 ± 0.4 g) was observed after the combined treatment processes that resulted in the formation of a porous structure. This can improve its specific area, and that way perhaps its enzyme adsorption capacity.

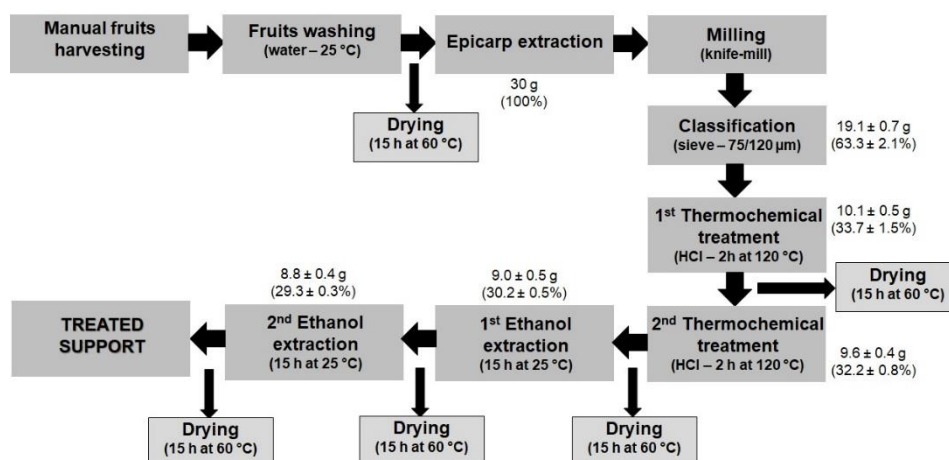


Figure 6. Process flow chart for the preparation of the support from macauba epicarp particles.

3.2. Characterization of the heterogeneous biocatalyst prepared via physical adsorption

The support material produced in this study was used in the physical adsorption of ET2.0 and its properties were compared with its soluble form (liquid lipase extract). Initially, the stability of the soluble lipase was evaluated under the immobilization conditions (5 mmol.L⁻¹ buffer sodium acetate pH 5.0 at 25 °C and 15 h). Under such conditions, ET2.0 fully retained its original hydrolytic activity. According to our results, 25.2 ± 1.3 mg protein.g⁻¹ of support was immobilized (almost five-times higher than that untreated support material), and this corresponds to 62.5% of the initially offered protein. This value was very similar to immobilization yield (YI value of 64.8 ± 2.5%), based on the units of hydrolytic activity that disappeared in the supernatant immobilization at equilibrium, thus showing that ET2.0 formulation has a very low amount of contaminant proteins (Martínez-Sánchez *et al.*, 2020). This demonstrates that the capacity of treated macauba epicarp particles to immobilize lipase was very similar or even higher than that of other supports such as silica-alumina supports – Siral 20 and Siral 40 (Pedro *et al.*, 2023), functionalized rice husk silica (Sabi *et al.*, 2022), metal-organic frameworks (Shomal *et al.*, 2022), and commercial Purolite® supports (Tacias-Pascacio *et al.*, 2016). In this study, the prepared biocatalyst was then utilized in the optimized production of solketal esters in a solvent-free system.

3.3. Optimization of enzymatic production of solketal esters via esterification reaction

The effect of three relevant parameters (FFAs:solketal molar ratio, reaction temperature and biocatalyst concentration) on the esters production via esterification of FFAs was evaluated using a full CCRD approach. The levels of each independent variable and fixed parameters (initial mass of raw materials, mechanical stirring intensity and reaction time) were chosen based on previous studies (Carvalho *et al.*, 2021; Guedes Júnior *et al.*, 2022; Mendoza-Ortiz *et al.*, 2020), and preliminary tests. Esterification is a thermodynamically controlled process (Sousa *et al.*, 2021). Therefore, the reactions were conducted in an open reactor for simple water removal by evaporation at atmospheric pressure. Moreover, a molar excess of solketal was utilized, which is more easily separated from the reaction mixture at the end of the process (purification steps).

Table 1. CCRD matrix for the analysis of the influence of independent variables on the enzymatic production of solketal esters in solvent-free systems.

Runs	Independent variables			FFAs conversion (%)
	Coded (actual)			
	FFAs:solketal molar ratio	Temperature (°C)	Biocatalyst concentration (% m.m ⁻¹)	
1	-1 (1:1.6)	-1 (46)	-1 (8)	6.2 ± 3.5
2	+1 (1:3.4)	-1 (46)	-1 (8)	30.2 ± 2.8
3	-1 (1:1.6)	+1 (64)	-1 (8)	23.4 ± 2.2
4	+1 (1:3.4)	+1 (64)	-1 (8)	24.6 ± 1.7
5	-1 (1:1.6)	-1 (46)	+1 (17)	44.5 ± 0.5
6	+1 (1:3.4)	-1 (46)	+1 (17)	40.5 ± 2.1
7	-1 (1:1.6)	+1 (64)	+1 (17)	43.0 ± 0.3
8	+1 (1:3.4)	+1 (64)	+1 (17)	30.1 ± 3.8
9	-1.68 (1:1)	0 (55)	0 (12.5)	21.7 ± 1.4
10	+1.68 (1:4)	0 (55)	0 (12.5)	22.2 ± 2.2
11	0 (1:2.5)	-1.68 (40)	0 (12.5)	28.9 ± 0.1
12	0 (1:2.5)	+1.68 (70)	0 (12.5)	39.8 ± 2.1
13	0 (1:2.5)	0 (55)	-1.68 (5)	19.3 ± 0.9
14	0 (1:2.5)	0 (55)	+1.68 (20)	55.7 ± 2.4
15	0 (1:2.5)	0 (55)	0 (12.5)	35.7 ± 1.3
16	0 (1:2.5)	0 (55)	0 (12.5)	30.2 ± 1.3
17	0 (1:2.5)	0 (55)	0 (12.5)	31.5 ± 0.3
18	0 (1:2.5)	0 (55)	0 (12.5)	33.0 ± 2.2

^a Experimental values obtained after 40 min of reaction.

The coded and actual values of these parameters and response (experimental and predicted FFAs conversion percentage) are shown in Table 1. According to our results, experimental FFAs conversion percentage values varied from 6.2 ± 3.5% (Run #1) to 55.7 ± 2.4% (Run #14) at 40 min of reaction. This large difference between minimum and maximum response variable values clearly shows the importance of the

optimization process proposed in this study. Experimental and predicted response values were very similar, which shows the high adequacy of the model (See Figure 7)

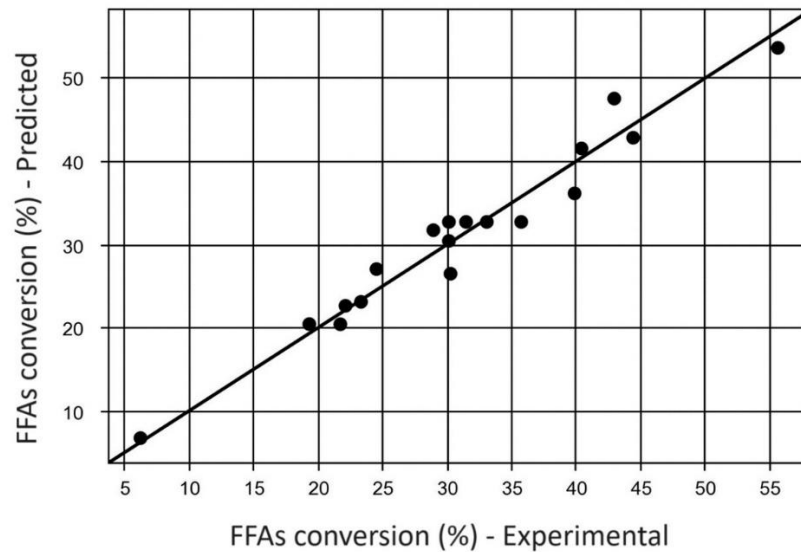


Figure 7. The relationship between experimental and predicted FFAs conversion percentage values for the enzymatic production of solketal esters from USCO.

The significance of each individual parameter and their interactions on the response variable (FFAs conversion percentage), determined by Student's *t*-test, is shown in Table 2. The analysis of variance (ANOVA) shows that the mean, quadratic term of FFAs:solketal molar ratio (x_1^2), linear term of biocatalyst concentration (x_3), and all interactions ($x_1.x_2$, $x_1.x_3$, and $x_2.x_3$) were statistically significant at 95% confidence level (p -values < 0.05). On the other hand, non-significant parameters (p -values > 0.05) were linear term of FFAs:solketal molar ratio (x_1), linear and quadratic terms of reaction temperature (x_2 and x_2^2), and quadratic term of biocatalyst concentration (x_3^2) were excluded from the model. The significant terms were then used to obtain the quadratic polynomial equation to explain how these independent variables influence the response in terms of coded values, as shown in Eq. (7).

$$Y(\%)=32.64 - 4.30x_1^2 + 9.88x_3 - 3.96x_1.x_2 - 5.27x_1.x_3 - 2.92x_2.x_3 \quad (7)$$

where x_1 , x_2 , and x_3 represent the FFAs:solketal molar ratio, reaction temperature and biocatalyst concentration, respectively.

Table 2. Regression coefficients, standard errors, p -values, and analysis of variance (ANOVA) for the developed model of enzymatic production of solketal esters.

Parameters	Regression coefficients	Standard errors	p -values
Mean	32.64	1.68	0.0000
x_1	0.66	0.91	0.4897*
x_1^2	-3.96	0.95	0.0031
x_2	1.32	0.91	0.1875*
x_2^2	0.43	0.95	0.6605*
x_3	9.88	0.91	0.0000
x_3^2	1.53	0.95	0.1457*
$x_1.x_2$	-3.96	1.19	0.0106
$x_1.x_3$	-5.27	1.19	0.0022
$x_2.x_3$	-2.92	1.19	0.0400

ANOVA				
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-test
Regression	2,058.6732	9	228.74	20.11
Residual	90.9850	8	11.37	
<i>Lack of fit</i>	74.0784	5	14.82	2.63
<i>Pure error</i>	16.9066	3	5.64	
Total	2,149.6582	17		

$R^2=0.9577$; $F_{0.05;9;8}=3.39$

x_1 , x_2 , and x_3 represent the parameters FFAs:solketal molar ratio, reaction temperature and biocatalyst concentration, respectively.

* Non-significant parameters at 95% confidence level.

The coefficient of determination (R^2) was used to demonstrate the adequacy of the model. According to Table 2, a R^2 value of 0.9577 was obtained. The adequacy of the quadratic model was also confirmed by Fisher's F -test, as shown in Table 2. The calculated F -value (20.11) was greater than the tabulated F -value at 5% significance level (3.39), which clearly shows its significance. On the other hand, the calculated F -value for lack of fit (2.63) was not significant (p -value > 0.05). Therefore, these results show that the proposed regression model can be used to predict and explore the 3D response surfaces and contour plots (Figure 8(A)–(B)) to determine the optimal experimental conditions of the reaction.

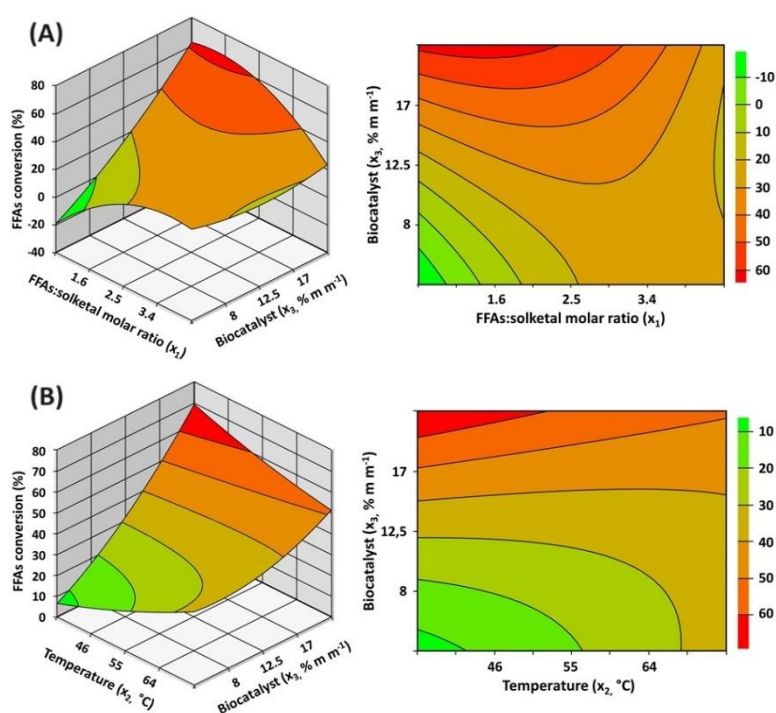


Figure 8. 3D response surface and contour plots for the enzymatic production of solketal esters. Effect of FFAs:solketal molar ratio and biocatalyst concentration (A), and reaction temperature and biocatalyst concentration (B) on the FFAs conversion percentage.

3D response surface and contour plots of the effect of the independent variables biocatalyst concentration and FFAs:solketal molar ratio on the reaction are shown in Figure 8(A). As it is expected, an increase in FFAs conversion percentage by raising biocatalyst concentration from 5% $m.m^{-1}$ (coded value of -1.68) to 20% $m.m^{-1}$ (coded value of $+1.68$) was observed. In fact, the highest coefficient value reported in Eq. (7) was obtained for the linear term of biocatalyst concentration ($+9.88x_3$), thus showing its positive and significant effect on the reaction. These results shows that maximum

FFAs conversion percentage can be obtained using a slight excess of solketal (FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6; coded value of -1). Their mutual interaction was significant at 95% confidence level with a negative effect on the reaction ($-5.27x_1.x_3$ – see Eq. (7)). Therefore, maximum ester production can be achieved at highest biocatalyst concentration – 20% m.m⁻¹ of reaction mixture (coded values of +1.68) and FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6 (coded value of -1).

The effect of reaction temperature and biocatalyst concentration is illustrated in Figure 8(B). 3D response surface and contour plots analyses show that maximum FFAs conversion percentage can be observed at highest biocatalyst concentration (20% m.m⁻¹; coded value of +1.68) and reaction temperature of 46 °C (coded value of -1). The interaction between these two individual parameters was also significant at 95% confidence level with a negative coefficient value ($-2.92x_2.x_3$), see Eq. (7). This means that a positive effect on the FFAs conversion can also be achieved using the highest biocatalyst concentration (20% m.m⁻¹) and reaction temperature of 46 °C.

The second-order polynomial model was validated by conducting a run under optimal conditions obtained from the analyses of 3D response surface and contour plots – FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6 (coded value of -1), reaction temperature of 46 °C (coded value of -1) and the highest coded level of biocatalyst concentration – 20% m.m⁻¹ (coded value of +1.68). Under such experimental conditions, a maximum FFAs conversion percentage of $50.8 \pm 1.0\%$ after 40 min of reaction was achieved, which was consistent with the predicted value ($Y = 54.7\%$). Therefore, further studies such as the effect of reaction time and operational stability (reuse) tests were conducted under such optimized conditions.

3.4. Influence of reaction time on the reaction

The influence of reaction time on the reaction was evaluated under optimal experimental conditions established by CCRD (FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6, reaction temperature of 46 °C and biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ of reaction mixture). In this set of experiments, soluble ET2.0 was not used as biocatalyst due to its lower stability and activity than that of its immobilized form in non-aqueous media – strong aggregation that may result in increased mass transfer limitations (Carvalho *et al.*, 2021; Guedes Júnior *et al.*, 2022). According to Figure 9, a linear profile of esters production was observed during the first 50 min of reaction, thus showing satisfactory

diffusivity of raw material molecules (FFAs and solketal) to the internal biocatalyst microenvironment. The highest FFAs conversion percentage around $72.5 \pm 0.8\%$ was achieved after 150 min of reaction. These results clearly show that an appropriate immobilization technique was capable of improving enzyme performance in this process, in accordance with previous reports (Badgujar *et al.*, 2021; Carvalho *et al.*, 2021; Guedes Júnior *et al.*, 2022; Martínez-Sánchez *et al.*, 2020).

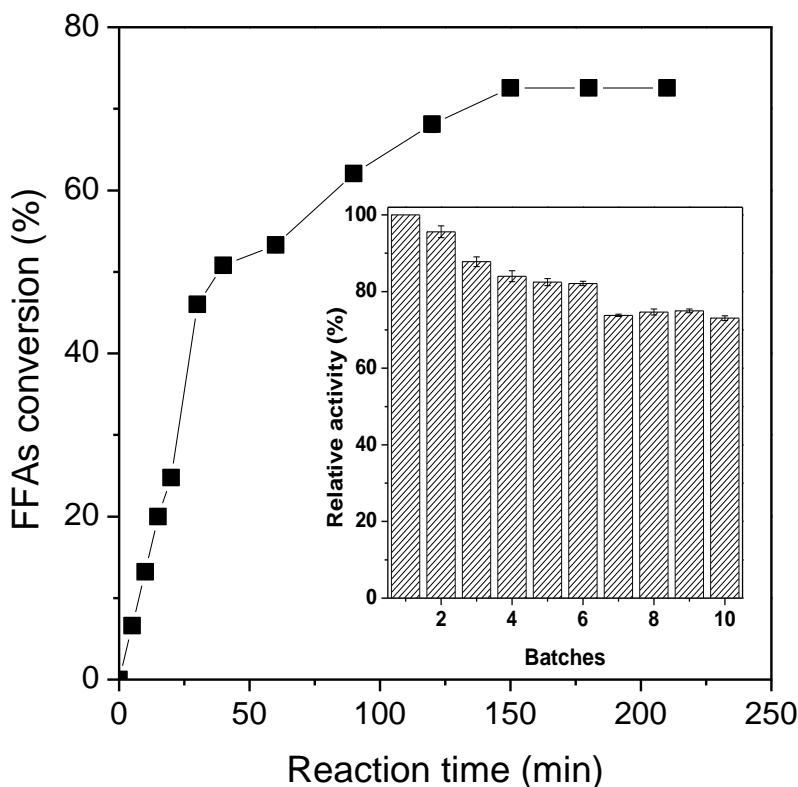


Figure 9. Influence of reaction time on the FFAs conversion percentage catalyzed by immobilized ET2.0. Inset is the operational stability tests after successive esterification batches in a solvent-free system. The reactions were conducted at 46 °C using a FFAs:solketal molar ratio of 1:1.6 and biocatalyst concentration of 20% m.m⁻¹ of reaction mixture.

3.5. Operational stability tests of the immobilized biocatalyst

The operational stability of immobilized ET2.0 after ten successive esterification batches under optimal experimental conditions was analyzed. According to Figure 9 (inset), the heterogeneous biocatalyst presented a decrease of its catalytic performance after seven successive esterification batches and this value remained unaltered until the tenth batch (FFAs conversion values around of 51% after 150 min

of reaction). This value corresponds to 70% of its original activity (FFAs conversion of $72.5 \pm 0.8\%$ at first batch). This decrease of catalytic performance could be due to thermal inactivation (Badgujar *et al.*, 2021), and/or possible accumulation of unconverted raw materials and/or products in the support, that can alter the microenvironment of the enzyme (Badgujar and Bhanage, 2016). These results clearly demonstrate the satisfactory stability of ET2.0 after successive batch reactions under moderate reactional conditions.

3.6. Identification of solketal esters by FT-IR analysis

FT-IR spectra of raw materials (solketal and FFAs) and product (solketal esters) are shown in Figure 10. The spectrum of FFAs shows intense bands at 2922 cm^{-1} and 1710 cm^{-1} attributed to stretching of C-H overlapped to O-H bond and stretching vibrational band of carbonyl group ($-\text{C}=\text{O}$) from the carboxylic moiety, respectively. Solketal spectrum presents an intense band at 3429 cm^{-1} attributed to the axial deformation of $-\text{O}-\text{H}$ bonds.

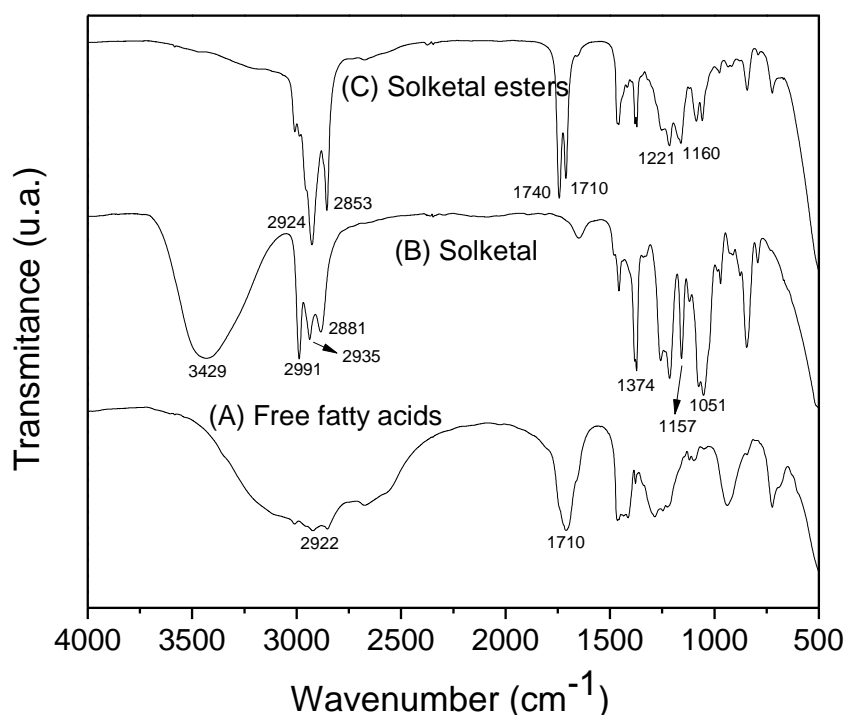


Figure 10. FT-IR spectra of free fatty acids from USCO (A), solketal (B), and solketal esters (C).

The bands between 2991 and 2881 cm^{-1} correspond to the vibration of symmetrical and asymmetrical stretching of $-\text{C}-\text{H}$ methyl and methylene groups. Moreover, the characteristic band between 1051 and 1157 cm^{-1} corresponds to the asymmetric vibrational of $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ bond presents in its structure. The spectrum of a solketal esters mixture shows an intense band at 1740 cm^{-1} characteristic of carbonyl group of the ester formed after esterification and the bands at 1221 and 1160 cm^{-1} to the stretching vibrational of $-\text{C}(=\text{O})\text{O}-$ group.

The production of solketal esters was also confirmed by NMR analysis, as shown in Figure 11 (A,B). ^{13}C NMR spectrum (Figure 11(B)) shows an intense signal at 172.51 ppm that corresponds to the carbonyl group of the ester $[-\text{CH}_2(\underline{\text{C}}=\text{O})\text{OCH}_2-]$. ^1H NMR spectrum (Figure 11(A)) showed specific signals of two-hydrogen triplet at 2.32 ppm for the methylene group bound to carbonyl group from the ester moiety $[-\text{CH}_2(\underline{\text{C}}=\text{O})\text{OCH}_2-]$, and two-hydrogen triplet at 4.13 ppm for the methylene group attached to the oxygen atom $[-\text{CH}_2(\text{C}=\text{O})\text{OCH}_2-]$. These spectroscopy analyses confirmed the production of solketal esters.

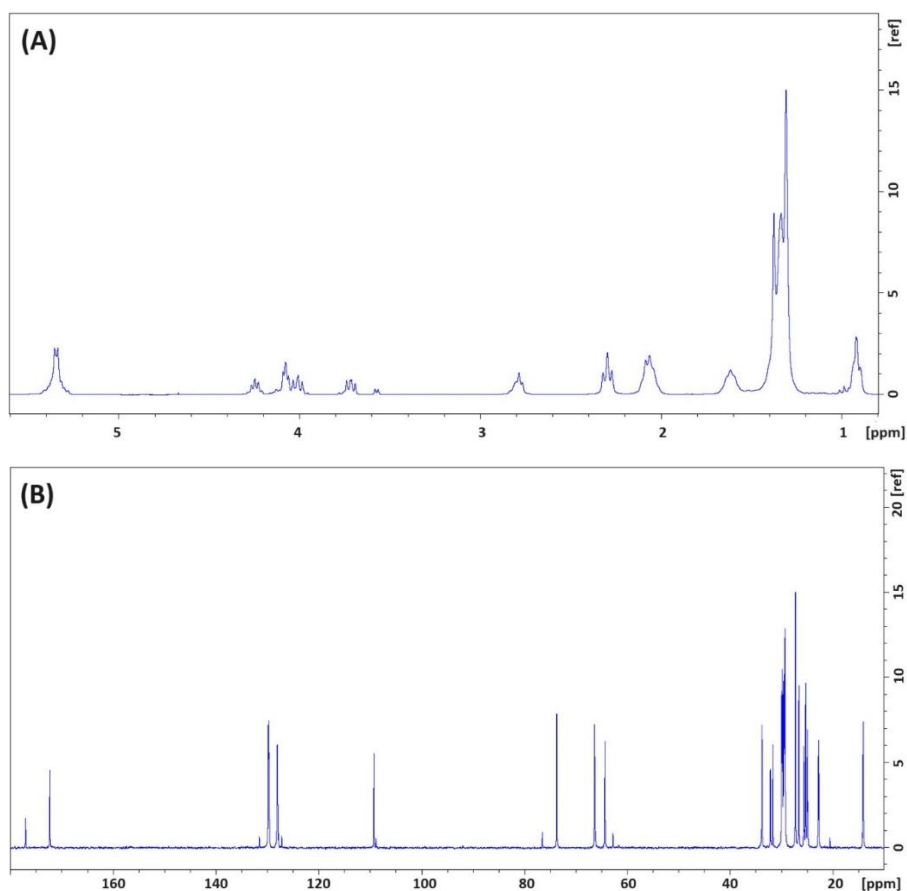


Figure 11. ^1H (A) NMR and ^{13}C (B) spectra of solketal esters.

3.7. Comparing with previous reports

The enzymatic production of solketal esters using different raw materials (synthetic monoesters, oils and fats and their derivatives – FFA) has been reported in previous reports, as shown in Table 3.

Table 3. Literature survey for the enzymatic production of solketal esters in batch systems.

Lipase source	Form	Starting material	Solvent	Reaction system	Yield/Conversion (%) – Reaction time	Reuse (residual activity - %)	Reference
<i>Pseudomonas cepacia</i>	Lyophilized crude extract	Enol esters	Cyclopentyl methyl ether	Transesterification	NR ^a	NP ^b	(Mine <i>et al.</i> , 2005)
<i>Aspergillus oryzae</i> MIM	Lyophilized mycelia	Butyric acid	Heptane	Esterification	52% – 24 h	NP ^b	(Romano <i>et al.</i> , 2006)
<i>Rhizopus oryzae</i>	Lyophilized mycelia	Soybean oil	Solvent-free	Hydroesterification	90% – 21 h (15 h + 6 h)	NP ^b	(Torregrosa <i>et al.</i> , 2016)
Lipase B from <i>Candida antarctica</i> (CALB)	Immobilized on Lewatit VP OC 1600 (Novozym 435)	WCO ^c or cottonseed oil with several FFA ^d	Hydrophobic ILs ^f	Esterification and transesterification	100% (6 h)	6 (≈100%)	(Lozano <i>et al.</i> , 2016)
		Methyl ricinoleate	Solvent-free	Transesterification	≥73% (5 h)	NP ^b	(Johny <i>et al.</i> , 2019)
	Treated Novozym 435 with IL ^e – [C ₁₈ tma][NTf ₂] ^f	Raw fish or linseed oils	Supercritical CO ₂	Transesterification	100% (6 h)	7 (80–90%)	(Villa <i>et al.</i> , 2020)
<i>Stemphylium lycopersici</i> and <i>Sordaria</i> sp.	Lyophilized mycelia or immobilized cells on PU ^g	Stearic acid	Presence or absence of organic solvents	Esterification	≥75% (48–72 h)	6 (0%)	(Rocha <i>et al.</i> , 2020)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (Lipolase 100 L)	Immobilized on Octyl-SiO ₂ from rice husks	Palmitic acid	Hexane	Esterification	83% – 2.5 h	7 (87%)	(Mendoza-Ortiz <i>et al.</i> , 2020)
<i>Thermomyces lanuginosus</i> (ET2.0 ^h)	Immobilized on treated macauba epicarp particles	FFA ^e from USCO ⁱ	Solvent-free	Esterification	72.5 ± 0.8% – 2.5 h	10 (70%)	This study

a – Not reported; b – Not performed; c – waste cooking oil; d – free fatty acids; e – ionic liquids; f – Octadecyltrimethylammonium bis(trifluoromethylsulfonyl)imide; g – polyurethane; h – Lipase Eversa[®] Transform 2.0; i – used soybean cooking oil.

In general, these reaction systems require large solvent amounts and reaction times to achieve high yield or conversion values. Solketal esters from soybean oil (Torregrosa *et al.*, 2016), and methyl ricinoleate (Johny *et al.*, 2019) were produced in solvent-free systems. However, reusability tests after successive batch reactions were not reported in these studies (see Table 3). On the other hand, this new heterogeneous biocatalyst demonstrated high retention of its activity after successive esterification batches conducted in a solvent-free system. This study shows that ET2.0 immobilized on epicarp macauba particles may provide the highest productivity and simpler downstream processes for separation/purification of the esters. This new process can be considered an attractive option for sustainable production of solketal esters due to its high catalytic activity and reusability.

4. Conclusion

In this study, a new and sustainable process was developed for the production of a valuable class of chemical compounds (solketal esters) from used soybean cooking oil by a two-step process – hydroesterification. For such a purpose, a new and active heterogeneous biocatalyst was prepared via immobilization by physical adsorption of a low-cost commercial lipase (ET2.0) on an agro-industrial support material (macauba epicarp particles). This study demonstrated that this material required some treatment steps for providing an adequate material for lipase immobilization, and that way to be used in the production of a heterogeneous biocatalyst with high enzyme loading and successful catalytic performance. This could be explained by the formation of a porous structure, which was confirmed by mass balance for the treatment process (mass loss around of 54%), FT-IR, XRD and SEM analyses. This generation of porosity allowed to adsorb ET2.0 molecules in its internal surface. This study clearly showed that the resulting heterogeneous biocatalyst was highly more active and stable in esterification reactions conducted under moderate conditions (46 °C). This is a relevant aspect of the proposed process, since it has a low energy demand for the production of an important class of chemicals. The development of an efficient and sustainable process using a waste oil as raw material and a lignocellulosic biomass waste as lipase support material can be considered a promising field for environmental researchers. Further studies will be conducted in our

research group aiming at the application of solketal esters as plasticizers for the production of flexible poly(vinyl chloride) (PVC) films. Moreover, it opens new possibilities for further studies regarding the application of the generated glycerol in the hydrolysis step for the production of solketal.

CRedit authorship contribution statement

José Miguel Jr. and João V. B. Dimas: Formal analysis, Investigation, Resources, Methodology, Data curation, and Writing – original draft. Milson S. Barbosa: Validation, Formal analysis, and Methodology. Raphael A. B. Gomes and Ana K. F. Carvalho: Formal analysis, Methodology, and Investigation. Cleide M. F. Soares: Conceptualization, Validation, and Formal analysis. Roberto Fernandez-Lafuente: Conceptualization, Funding acquisition, and Writing – review & editing. Adriano A. Mendes: Conceptualization, Writing – review & editing, Supervision, and Funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

The present study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brazil – Finance Code 001. The authors are also thankful for the financial support of Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – Brazil (Process APQ-01691-21) and Ministerio de Ciencia e Innovación, and Agencia Estatal de Investigación (Spanish Government) (PID2022-136535OB-I00). Adriano A. Mendes thanks the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the research fellowship (PQ-2 CA BI, Grant 306253/2023-2). José Miguel Jr. and João V. B. Dimas thank the FAPEMIG and CNPq Foundation for the student fellowships, respectively.

Acknowledgements

The authors thank the UFMG Microscopy Center (<http://www.microscopia.ufmg.br>) for providing the equipment and technical support for SEM analysis and Laboratory of Crystallography (Institute of Chemistry – UNIFAL/MG) for the XRD analysis. We also thank Ángel Berenguer-Murcia (Universidad de Alicante, Alicante, Spain) for the kind suggestions during the writing of this paper.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or

personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this manuscript.

References

- Alves, M.D., Aracri, F.M., Cren, É.C., Mendes, A.A., 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>
- Ampese, L.C., Buller, L.S., Monroy, Y.M., Garcia, M.P., Ramos-Rodriguez, A.R., Forster-Carneiro, T., 2021. Macaúba's world scenario: a bibliometric analysis. *Biomass Convers. Biorefinery* 13, 3329–3347. <https://doi.org/10.1007/S13399-021-01376-2>
- Badgujar, K.C., Bhanage, B.M., 2016. The green metric evaluation and synthesis of diesel-blend compounds from biomass derived levulinic acid in supercritical carbon dioxide. *Biomass Bioenergy* 84, 12–21. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2015.11.007>
- Badgujar, V.C., Badgujar, K.C., Yeole, P.M., Bhanage, B.M., 2021. Investigation of effect of ultrasound on immobilized *C. rugosa* lipase: Synthesis of biomass based furfuryl derivative and green metrics evaluation study. *Enzyme Microb. Technol.* 144, 109738. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109738>
- Barbosa, S.L., Lima, P.C., dos Santos, W.T.P., Klein, S.I., Clososki, G.C., Caires, F.J., 2019. Oxygenated biofuels: Synthesis of fatty acid solketal esters with a mixture of sulfonated silica and (Bu₄N)(BF₄) catalyst. *Catal. Commun.* 120, 76–79. <https://doi.org/10.1016/J.CATCOM.2018.12.005>
- Bijoy, G., Rajeev, R., Benny, L., Jose, S., Varghese, A., 2022. Enzyme immobilization on biomass-derived carbon materials as a sustainable approach towards environmental applications. *Chemosphere* 307, 135759. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2022.135759>
- Bolivar, J.M., Woodley, J.M., Fernandez-Lafuente, R., 2022. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. *Chem. Soc. Rev.* 51, 6251–6290. <https://doi.org/10.1039/d2cs00083k>
- Boncel, S., Zniszczoł, A., Szymańska, K., Mrowiec-Białoń, J., Jarzebski, A., Walczak, K.Z., 2013. Alkaline lipase from *Pseudomonas fluorescens* non-covalently

- immobilised on pristine versus oxidised multi-wall carbon nanotubes as efficient and recyclable catalytic systems in the synthesis of Solketal esters. *Enzyme Microb. Technol.* 53, 263–270. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2013.05.003>
- Boudrant, J., Woodley, J.M., 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>
- Bradford, M.M., 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)
- Cardoso, A., Laviola, B.G., Santos, G.S., de Sousa, H.U., de Oliveira, H.B., Veras, L.C., Ciannella, R., Favaro, S.P., 2017. Opportunities and challenges for sustainable production of *A. aculeata* through agroforestry systems. *Ind. Crops Prod.* 107, 573–580. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2017.04.023>
- Carvalho, W.C.A., Luiz, J.H.H., Fernandez-Lafuente, R., Hirata, D.B., Mendes, A.A., 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>
- Chawla, S.K., Goyal, D., 2023. Optimization of pretreatment of wheat straw using response surface methodology for production of lactic acid using *Bacillus sonorensis* strain DGS15. *Bioenergy Res.* 16, 967–978. <https://doi.org/10.1007/S12155-022-10439-9>
- Costa, S.E. de L., Dos Santos, R.C., Castro, R.V.O., Castro, A.F.N.M., Magalhães, M.A. de, Carneiro, A. de C.O., Santos, C.P. de S., Gomes, I.R.F., Rocha, S.M.G., 2019. Briquettes quality produced with the macauba epicarp (*Acrocomia aculeata*) and *Pinus* sp. wood. *Rev. Árvore* 43, e430501. <https://doi.org/10.1590/1806-90882019000500001>
- Da Silva Junior, V.A., Shigueyuki Kanda, L.R., Zandoná-Filho, A., Corazza, M.L., Sutile De Lima, C., 2020. Effect of supercritical carbon dioxide over the esterification of levulinic acid with ethanol using montmorillonite K10 as catalyst. *J. CO2 Util.* 39, 101158. <https://doi.org/10.1016/J.JCOU.2020.101158>
- Data Bridge Market Research, 2020. Solketal Market Scope, Segmentation, Key Players, Trends, & Analysis by 2028.

<https://www.databridgemarketresearch.com/reports/global-solketal-market>
(accessed 10.11.23).

- De María, P.D., Sánchez-Montero, J.M., Sinisterra, J. V., Alcántara, A.R., 2006. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnol. Adv.* 24, 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>
- Du, S.K., Su, X., Yang, W., Wang, Y., Kuang, M., Ma, L., Fang, D., Zhou, D., 2016. Enzymatic saccharification of high pressure assist-alkali pretreated cotton stalk and structural characterization. *Carbohydr. Polym.* 140, 279–286. <https://doi.org/10.1016/J.CARBPOL.2015.12.056>
- Evaristo, A.B., Grossi, J.A.S., Pimentel, L.D., de Melo Goulart, S., Martins, A.D., dos Santos, V.L., Motoike, S., 2016. Harvest and post-harvest conditions influencing macauba (*Acrocomia aculeata*) oil quality attributes. *Ind. Crops Prod.* 85, 63–73. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2016.02.052>
- Foo, W.H., Chia, W.Y., Tang, D.Y.Y., Koay, S.S.N., Lim, S.S., Chew, K.W., 2021. The conundrum of waste cooking oil: Transforming hazard into energy. *J. Hazard. Mater.* 417, 126129. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126129>
- Girelli, A.M., Astolfi, M.L., Scuto, F.R., 2020. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere* 244, 125368. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2019.125368>
- Girelli, A.M., Chiappini, V., 2023. Renewable, sustainable, and natural lignocellulosic carriers for lipase immobilization: A review. *J. Biotechnol.* 365, 29–47. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTEC.2023.02.003>
- Guedes Júnior, J.G.E., Mattos, F.R., Sabi, G.J., Carvalho, W.C.A., Luiz, J.H.H., Cren, É.C., Fernandez-Lafuente, R., Mendes, A.A., 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>
- Hosseinzadeh-Bandbafha, H., Li, C., Chen, X., Peng, W., Aghbashlo, M., Lam, S.S., Tabatabaei, M., 2022. Managing the hazardous waste cooking oil by conversion into bioenergy through the application of waste-derived green catalysts: A review. *J. Hazard. Mater.* 424, 127636. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.127636>
- Itabaiana, I., Gonçalves, K.M., Zoumpantioti, M., Leal, I.C.R., Miranda, L.S.M.E., Xenakis, A., De Souza, R.O.M.A., 2014. Microemulsion-based organogels as an efficient support for lipase-catalyzed reactions under continuous-flow conditions.

- Org. Process Res. Dev. 18, 1372–1376. <https://doi.org/10.1021/OP500136C>
- Johny, J., Jatla, A., Eruva, V.K., Misra, S., Kaki, S.S., 2019. Synthesis, characterization and evaluation of 1-monoacylglycerols of unsaturated fatty acids as potential bioactive lipids. *Grasas Aceites* 70, e325–e325. <https://doi.org/10.3989/GYA.1052182>
- Junior, I.I., Flores, M.C., Sutili, F.K., Leite, S.G.F., Leandro, L.S., Leal, I.C.R., De Souza, R.O.M.A., 2012. Fatty acids residue from palm oil refining process as feedstock for lipase catalyzed monoacylglycerol production under batch and continuous flow conditions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 77, 53–58. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2012.01.008>
- Kenar, J.A., Knothe, G., 2008. 1,2-isopropylidene glycerol carbonate: Preparation, characterization, and hydrolysis. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 85, 365–372. <https://doi.org/10.1007/S11746-008-1201-6>
- Kim, B.H., Hwang, J., Akoh, C.C., 2023. Liquid microbial lipase - recent applications and expanded use through immobilization. *Curr. Opin. Food Sci.* 50, 100987. <https://doi.org/10.1016/J.COFS.2023.100987>
- Kim, D.Y., Lee, B.M., Koo, D.H., Kang, P.H., Jeun, J.P., 2016. Preparation of nanocellulose from a kenaf core using E-beam irradiation and acid hydrolysis. *Cellulose* 23, 3039–3049. <https://doi.org/10.1007/S10570-016-1037-4>
- Lee, H.N., Jang, H.J., Woo, J.W., 2023. Synthesis and plasticity of cyclic ester compounds using fatty acids. *Appl. Chem. Eng.* 34, 252–257. <https://doi.org/10.14478/ACE.2023.1030>
- Li, M., Butka, E., Wang, X., 2014. Comprehensive quantification of triacylglycerols in soybean seeds by electrospray ionization mass spectrometry with multiple neutral loss scans. *Sci. Reports* 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep06581>
- Lopes, D.D.C., Steidle Neto, A.J., Mendes, A.A., Pereira, D.T.V., 2013. Economic feasibility of biodiesel production from Macauba in Brazil. *Energy Econ.* 40, 819–824. <https://doi.org/10.1016/j.eneco.2013.10.003>
- Lozano, P., Gomez, C., Nicolas, A., Polo, R., Nieto, S., Bernal, J.M., García-Verdugo, E., Luis, S. V., 2016. Clean enzymatic preparation of oxygenated biofuels from vegetable and waste cooking oils by using spongelike ionic liquids technology. *ACS Sustain. Chem. Eng.* 4, 6125–6132. <https://doi.org/10.1021/ACSSUSCHEMENG.6B01570>
- Machado, N.B., Miguez, J.P., Bolina, I.C.A., Salviano, A.B., Gomes, R.A.B., Tavano,

- O.L., Luiz, J.H.H., Tardioli, P.W., Cren, É.C., Mendes, A.A., 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>
- Mankar, A.R., Pandey, A., Modak, A., Pant, K.K., 2021. Pretreatment of lignocellulosic biomass: A review on recent advances. *Bioresour. Technol.* 334, 125235. <https://doi.org/10.1016/J.BIORTECH.2021.125235>
- Mariam, N.M.D.N.S., Hoong, S.S., Arniza, M.Z., Adnan, S., Ismail, T.N.M.T., Yeong, S.K., Yusop, M.R., 2022. Optimisation of reaction parameters for the synthesis of solketal levulinate as potential biodiesel additive. *J. Oil Palm Res.* 34, 524–534. <https://doi.org/10.21894/JOPR.2021.0052>
- Martínez-Sánchez, J.A., Arana-Peña, S., Carballares, D., Yates, M., Otero, C., Fernández-Lafuente, R., 2020. Immobilized biocatalysts of Eversa® Transform 2.0 and lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Comparison of some properties and performance in biodiesel production. *Catalysts* 10, 738. <https://doi.org/10.3390/CATAL10070738>
- Mendoza-Ortiz, P.A., Gama, R.S., Gómez, O.C., Luiz, J.H.H., Fernández-Lafuente, R., Cren, E.C., Mendes, A.A., 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>
- Mine, Y., Zhang, L., Fukunaga, K., Sugimura, Y., 2005. Enhancement of enzyme activity and enantioselectivity by cyclopentyl methyl ether in the transesterification catalyzed by *Pseudomonas cepacia* lipase co-lyophilized with cyclodextrins. *Biotechnol. Lett.* 27, 383–388. <https://doi.org/10.1007/s10529-005-1527-1>
- Monteiro, R.R.C., Arana-Peña, S., da Rocha, T.N., Miranda, L.P., Berenguer-Murcia, Á., Tardioli, P.W., dos Santos, J.C.S., Fernández-Lafuente, R., 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>
- Neamtu, C., Stepan, E., Plesu, V., Bozga, G., Tuluc, A., 2019. Synthesis and characterization of new solketal alkylesters usable as diesel biobased fuel additives. *Rev. Chim.* 70, 1167–1172. <https://doi.org/10.37358/RC.19.4.7086>
- Olson, A.L., Tunér, M., Verhelst, S., 2023. A concise review of glycerol derivatives for

- use as fuel additives. *Heliyon* 9, e13041. <https://doi.org/10.1016/J.HELIYON.2023.E13041>
- Parchami, M., Agnihotri, S., Taherzadeh, M.J., 2022. Aqueous ethanol organosolv process for the valorization of Brewer's spent grain (BSG). *Bioresour. Technol.* 362, 127764. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127764>
- Park, Y.W., Jeong, M.K., Park, C., Lee, J., 2011. Distribution of triacylglycerols and fatty acids in soybean oil with thermal oxidation and methylene blue photosensitization. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88, 373–380. <https://doi.org/10.1007/S11746-010-1683-X>
- Pedro, K.C.N.R., da Silva, J.V.V., Cipolatti, E.P., Manoel, E.A., Campisano, I.S.P., Henriques, C.A., Langone, M.A.P., 2023. Adsorption of lipases on porous silica-based materials for esterification in a solvent-free system. *3 Biotech* 13, 1–14. <https://doi.org/10.1007/S13205-023-03801-X>
- Perosa, A., Moraschini, A., Selva, M., Noè, M., 2016. Synthesis of the fatty esters of solketal and glycerol-formal: Biobased specialty chemicals. *Molecules* 21, 170. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES21020170>
- Qureshi, A.S., Ji, X., Khushk, I., Mirjatt, A.N., Tunio, A.A., Huang, Y., 2023. Ionic liquid and diluted sulfuric acid combinatorial pretreatment for efficient sugarcane bagasse conversion to L-lactic acid. *Ind. Crops Prod.* 204, 117272. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2023.117272>
- Rocha, K.S.C., Queiroz, M.S.R., Gomes, B.S., Dallago, R., de Souza, R.O.M.A., Guimarães, D.O., Itabaiana, I., Leal, I.C.R., 2020. Lipases of endophytic fungi *Stemphylium lycopersici* and *Sordaria* sp.: Application in the synthesis of solketal derived monoacylglycerols. *Enzyme Microb. Technol.* 142, 109664. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109664>
- Rodrigues, R.C., Virgen-Ortíz, J.J., dos Santos, J.C.S., Berenguer-Murcia, Á., Alcantara, A.R., Barbosa, O., Ortiz, C., Fernandez-Lafuente, R., 2019. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol. Adv.* <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>
- Romano, D., Ferrario, V., Molinari, F., Gardossi, L., Montero, J.M.S., Torre, P., Converti, A., 2006. Kinetic resolution of (R, S)-1,2-O-isopropylidenglycerol by esterification with dry mycelia of moulds. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 41, 71–74. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCATB.2006.04.009>

- Sabi, G.J., Gama, R.S., Fernandez-Lafuente, R., Cancino-Bernardi, J., Mendes, A.A., 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>
- Sankaranarayanan, S., Jindapon, W., Ngamcharussrivichai, C., 2017. Valorization of biodiesel plant-derived products via preparation of solketal fatty esters over calcium-rich natural materials derived oxides. *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 81, 57–64. <https://doi.org/10.1016/J.JTICE.2017.10.007>
- Sarno, M., Iuliano, M., Cirillo, C., 2019. Optimized procedure for the preparation of an enzymatic nanocatalyst to produce a bio-lubricant from waste cooking oil. *Chem. Eng. J.* 377, 120273. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2018.10.210>
- Schmid, R.D., 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)
- Shomal, R., Du, W., Al-Zuhair, S., 2022. Immobilization of lipase on metal-organic frameworks for biodiesel production. *J. Environ. Chem. Eng.* 10, 107265. <https://doi.org/10.1016/J.JECE.2022.107265>
- Silva, L.N., Fortes, I.C.P., De Sousa, F.P., Pasa, V.M.D., 2016. Biokerosene and green diesel from macauba oils via catalytic deoxygenation over Pd/C. *Fuel* 164, 329–338. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2015.09.081>
- Sousa, R.R., Silva, A.S., Fernandez-Lafuente, R., Ferreira-Leitão, V.S., 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>
- Stergiou, P.Y., Foukis, A., Filippou, M., Koukouritaki, M., Parapouli, M., Theodorou, L.G., Hatziloukas, E., Afendra, A., Pandey, A., Papamichael, E.M., 2013. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. *Biotechnol. Adv.* 31, 1846–1859. <https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2013.08.006>
- Sultanova, R.M., Khusnutdinova, N.S., Borisova, Y.G., Raskildina, G.Z., Meshcheryakova, S.A., Samorodov, A. V., Zlotsky, S.S., 2023. Selective synthesis of some carboxylic acids esters. *Russ. J. Gen. Chem.* 93, 1–7. <https://doi.org/10.1134/S1070363223010012>

- Tacias-Pascacio, V.G., Peirce, S., Torrestiana-Sanchez, B., Yates, M., Rosales-Quintero, A., Virgen-Ortíz, J.J., Fernandez-Lafuente, R., 2016. Evaluation of different commercial hydrophobic supports for the immobilization of lipases: tuning their stability, activity and specificity. *RSC Adv.* 6, 100281–100294. <https://doi.org/10.1039/C6RA21730C>
- Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, N.A.S., Najaafi, N., Tarighi, S., 2018. A review on the catalytic acetalization of bio-renewable glycerol to fuel additives. *Front. Chem.* 6, 421298. <https://doi.org/10.3389/FCHEM.2018.00573>
- Torregrosa, R., Yara-Varón, E., Balcells, M., Torres, M., Canela-Garayoa, R., 2016. Entirely solvent-free biocatalytic synthesis of solketal fatty esters from soybean seeds. *Comptes Rendus Chim.* 19, 749–753. <https://doi.org/10.1016/J.CRCI.2015.12.015>
- Verger, R., 1997. “Interfacial activation” of lipases: Facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0)
- Villa, R., Alvarez, E., Nieto, S., Donaire, A., Garcia-Verdugo, E., Luis, S. V., Lozano, P., 2020. Chemo-enzymatic production of omega-3 monoacylglycerides using sponge-like ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Green Chem.* 22, 5701–5710. <https://doi.org/10.1039/D0GC02033H>
- Wu, D., Wei, Z., Mohamed, T.A., Zheng, G., Qu, F., Wang, F., Zhao, Y., Song, C., 2022. Lignocellulose biomass bioconversion during composting: Mechanism of action of lignocellulase, pretreatment methods and future perspectives. *Chemosphere* 286, 131635. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.131635>
- Yang, J., Ma, W.J., Li, N., Zhou, J.H., Sun, H.Z., 2014. Synthesis of tung oil monoglyceride. *Adv. Mater. Res.* 941–944, 1021–1025. <https://doi.org/10.4028/WWW.SCIENTIFIC.NET/AMR.941-944.1021>
- Zhang, S., Gao, H., Li, J., Huang, Y., Alsaedi, A., Hayat, T., Xu, X., Wang, X., 2017. Rice husks as a sustainable silica source for hierarchical flower-like metal silicate architectures assembled into ultrathin nanosheets for adsorption and catalysis. *J. Hazard. Mater.* 321, 92–102. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2016.09.004>
- Zniszczol, A., Walczak, K., 2014. Lipases Aided Esterification of (2,2-Dimethyl-1,3-dioxolan-4-yl)methanol. *Lett. Org. Chem.* 11, 6–12. <https://doi.org/10.2174/157017861101140113155507>

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo, foi desenvolvido um processo sustentável para a síntese enzimática de ésteres de solketila a partir de óleo de soja usado, utilizando o método de hidroesterificação. Inicialmente, uma mistura de ácidos graxos livres (AGL) foi obtida por meio da completa hidrólise do OSU, utilizando como catalisador a lipase de *Candida rugosa* (LCR). Na segunda etapa do processo, os AGLs resultantes da etapa de hidrólise foram empregados na produção enzimática dos ésteres, em um meio isento de solventes e utilizando reatores abertos para facilitar a evaporação da água formada durante a reação. Na etapa de esterificação, foi empregado um catalisador de baixo custo, o Eversa[®] Transform 2.0, imobilizada por ativação interfacial em partículas pré-tratadas do epicarpo do fruto da macaúba. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma excelente capacidade de adsorção da enzima, destacando-se como uma alternativa viável para aplicações industriais. Utilizando um (DCCR), as melhores condições experimentais para a produção dos ésteres de solketila foram determinadas como sendo uma temperatura de 46 °C, uma razão molar entre AGLs: solketal de 1:1.6 e uma concentração de biocatalisador de 20% em massa. Nessas condições, o biocatalisador imobilizado demonstrou uma conversão de AGL de $72.5 \pm 0.8\%$ em 150 minutos. Estes resultados evidenciam que a técnica de imobilização foi uma estratégia fundamental na produção de biocatalisadores com um melhor desempenho na reação de esterificação. Além disso, o biocatalisador heterogêneo desenvolvido pode ser facilmente separado da mistura reacional por meio de um simples processo de filtração e reutilizado em até dez bateladas sucessivas de esterificação, evidenciando sua viabilidade e eficiência em processos industriais. Além disso, este trabalho utiliza duas matérias-primas de extrema relevância: o óleo de soja usado e o solketal. O óleo de soja usado é uma escolha estratégica, dado que o Brasil se destaca como o maior produtor de soja do mundo, tornando essa matéria-prima um recurso prontamente disponível e economicamente viável. Ademais, o solketal também desempenha um papel crucial no contexto deste estudo. Sua relevância decorre das recentes políticas brasileiras que promovem o aumento da mistura de biodiesel, no diesel fóssil, o que de forma direta irá resultar na maior produção de solketal. Desta forma, este estudo contribui significativamente para o avanço de abordagens sustentáveis e economicamente viáveis na produção de oleoquímicos de valor agregado e promove a criação de novos suportes e compostos

com potencial para uma ampla gama de aplicações através do aproveitamento de resíduos agroindustriais.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Francisco Lucas Chaves *et al.* Trends in lipase immobilization: bibliometric review and patent analysis. **Process Biochemistry**, v. 110, p. 37–51, Jan. 2021.
- ANG, Tze-Zhang *et al.* A comprehensive study of renewable energy sources: classifications, challenges and suggestions. **Energy Strategy Reviews**, v. 43, p. 100939, Sept. 2022.
- NOOR ARMYLISAS, A. H. *et al.* Modification of olefinic double bonds of unsaturated fatty acids and other vegetable oil derivatives via epoxidation: A review. **Grasas y Aceites**, v. 68, n. 1, p. 174, Mar. 2017.
- BAENA, Alexander *et al.* Enzymatic hydrolysis of waste fats, oils and greases (FOGs): status, prospective, and process intensification alternatives. **Chemical Engineering and Processing - Process Intensification**, v. 175, p. 108930, Apr. 2022.
- BHATIA, Shashi Kant *et al.* Conversion of waste cooking oil into biodiesel using heterogenous catalyst derived from cork biochar. **Bioresource Technology**, v. 302, p. 122872, Dec. 2020.
- BIJOY, Geethanjali *et al.* Enzyme immobilization on biomass-derived carbon materials as a sustainable approach towards environmental applications. **Chemosphere**, p. 135759, July 2022.
- BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Agência Nacional do Petróleo Gás Natural e Biocombustíveis. **Biodiesel**. Brasília, DF: MME, 13 jul. 2020. Atualizado em 09 jan. 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 15 jun. 2024.
- CASTRO, Carla Aparecida de O. *et al.* High-performance prediction of macauba fruit biomass for agricultural and industrial purposes using artificial neural networks. **Industrial Crops and Products**, v. 108, p. 806–813, Mar. 2017.
- COLOMBO, Carlos Augusto *et al.* Macauba: a promising tropical palm for the production of vegetable oil. **OCL**, v. 25, n. 1, p. D108, Aug. 2017.
- CORRÊA, Isabella; FARIA, Rui P. V.; RODRIGUES, Alírio E. Continuous valorization of glycerol into solketal: recent advances on catalysts, processes, and industrial perspectives. **Sustainable Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 286–324, Apr. 2021.
- COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Immobilized enzyme-driven value enhancement of lignocellulosic-based agricultural byproducts: application in aroma synthesis. **Journal of Cleaner Production**, v. 284, p. 124728, Feb. 2021.

COSTA-SILVA, T. A. *et al.* Highly effective *Candida rugosa* lipase immobilization on renewable carriers: integrated drying and immobilization process to improve enzyme performance. **Chemical Engineering Research and Design**, Apr. 2022.

DA COSTA LIMA PIRES, Pâmela *et al.* Strategies to improve the competitiveness of an agroindustrial system for a macauba based oil production in Minas Gerais State, Brazil. **Land Use Policy**, v. 126, Mar. 2023.

DE FEO, Giovanni *et al.* Assessment of three recycling pathways for waste cooking oil as feedstock in the production of biodiesel, biolubricant, and biosurfactant: a multi-criteria decision analysis approach. **Recycling**, v. 8, n. 4, p. 64, Aug. 2023.

DE, Sudipta *et al.* Biomass-derived porous carbon materials: synthesis and catalytic applications. **ChemCatChem**, v. 7, n. 11, p. 1608–1629, May 2015.

DEL RÍO, José C. *et al.* Chemical composition and thermal behavior of the pulp and kernel oils from macauba palm (*Acrocomia aculeata*) fruit. **Industrial Crops and Products**, v. 84, p. 294–304, June 2016.

GONÇALVES FILHO, Danielle; SILVA, Amanda Gonçalves; GUIDINI, Carla Zanella. Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 103, n. 18, p. 7399–7423, Aug. 2019.

FU, Boyi; VASUDEVAN, Palligarnai T. Effect of organic solvents on enzyme-catalyzed synthesis of biodiesel. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 8, p. 4105–4111, Aug. 2009.

GAUR, Vivek K. *et al.* Production of biosurfactants from agro-industrial waste and waste cooking oil in a circular bioeconomy: an overview. **Bioresource Technology**, v. 343, n. October 2021, p. 126059, Jan. 2022.

GIRELLI, Anna Maria; ASTOLFI, Maria Luisa; SCUTO, Francesca Romana. Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: a review. **Chemosphere**, v. 244, Apr. 2020.

GIRELLI, Anna Maria; CHIAPPINI, Viviana. Renewable, sustainable, and natural lignocellulosic carriers for lipase immobilization: a review. **Journal of Biotechnology**, Feb. 2023.

GUEDES JÚNIOR, José 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, Feb. 2022.

HOSSEINZADEH-BANDBAFHA, Homa *et al.* Environmental life cycle assessment of biodiesel production from waste cooking oil: a systematic review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 161, p. 112411, Apr. 2022.

ITABAIANA, I. *et al.* Kinetics and mechanism of lipase catalyzed monoacylglycerols synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 96, p. 34–39, Dec. 2013.

KHODADADI, Mohamad Reza *et al.* Innovative continuous synthesis of solketal. **Journal of Flow Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 725–735, Mar. 2021.

KIM, Hak Ju *et al.* Development of heterogeneous catalyst system for esterification of free fatty acid contained in used vegetable oil. **Studies in Surface Science and Catalysis**, v. 153, n. 1, p. 201–204, Apr. 2004.

KOVALENKO, Galina; PERMINOVA, Larisa; BEKLEMISHEV, Anatoly. Heterogeneous biocatalytical esterification by recombinant *Thermomyces lanuginosus* lipase immobilized on macroporous carbon aerogel. **Catalysis Today**, v. 379, p. 36–41, Dec. 2020.

LIU, Dong Mei; CHEN, Juan; SHI, Yan Ping. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 102, p. 332–342, May 2018.

LIU, Shan *et al.* Hydrothermal modification of lignocellulosic waste as microbial immobilization carriers for ethanol production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 142, p. 27–33, Feb. 2019.

MANNU, Alberto; FERRO, Monica; DUGONI, Greta Colombo; *et al.* Improving the recycling technology of waste cooking oils: Chemical fingerprint as tool for non-biodiesel application. **Waste Management**, v. 96, p. 1–8, Aug. 2019.

MANNU, Alberto; FERRO, Monica; DI PIETRO, Maria Enrica; *et al.* Innovative applications of waste cooking oil as raw material. **Science Progress**, v. 102, n. 2, p. 153–160, June 2019.

MATTOS, Fernanda R. *et al.* Design of a new chemoenzymatic process for producing epoxidized monoalkyl esters from used soybean cooking oil and fusel oil. **Catalysts**, v. 13, n. 3, p. 1–17, Mar. 2023.

MELANI, Natália B.; TAMBOURGI, Elias B.; SILVEIRA, Edgar. Lipases: from production to applications. **Separation and Purification Reviews**, v. 49, n. 2, p. 143–158, Jan. 2020.

MENDOZA-ORTIZ, Patricia A. *et al.* Sustainable enzymatic synthesis of a solketal ester—process optimization and evaluation of its antimicrobial activity. **Catalysts**, v. 10, n. 2, Feb. 2020.

MIGUEL JÚNIOR, José *et al.* Improved catalytic performance of lipase Eversa[®] Transform 2.0 via immobilization for the sustainable production of flavor esters—Adsorption process and environmental assessment studies. **Catalysts**, v. 12, n. 11, Nov. 2022.

MITTAINÉ, Jean François. The oil & protein crop supply chain in South America: introduction. **OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids**, v. 25, n. 1, Jan. 2018.

MOLINA-GUTIÉRREZ, María *et al.* Immobilized forms of the *Ophiostoma piceae* lipase for green synthesis of biodiesel: comparison with Eversa Transform 2.0 and Cal A. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 10, p. 822, 30 Sept. 2021.

MONTEIRO, Rodolpho R. C. *et al.* Biocatalytic production of biolubricants: strategies, problems and future trends. **Biotechnology Advances**, p. 108215, July 2023.

MOREIRA, Sandro Lucio Silva *et al.* Above- and below-ground carbon accumulation in cultivated macauba palm and potential to generate carbon credits. **Journal of Cleaner Production**, v. 265, p. 121628, Aug. 2020.

NÁJERA-MARTÍNEZ, Erik Francisco *et al.* Lignocellulosic residues as supports for enzyme immobilization, and biocatalysts with potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 208, n. March, p. 748–759, May 2022.

NANDA, Malaya R. *et al.* Catalytic conversion of glycerol for sustainable production of solketal as a fuel additive: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 56, n. 1, p. 1022–1031, Apr. 2016.

PARANDI, Ehsan *et al.* Biodiesel production from waste cooking oil using a novel biocatalyst of lipase enzyme immobilized magnetic nanocomposite. **Fuel**, v. 313, p. 123057, Apr. 2022.

RESEARCH COLLABORATORY FOR STRUCTURAL BIOINFORMATICS PROTEIN DATA BANK. **3D structures, 1DTE, download files, PDB format**. [Piscataway, New Jersey]: RCSB PDB, 20 Dec. 2000. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1DT3>. Acesso em: 27 nov. 2023

RESEARCH COLLABORATORY FOR STRUCTURAL BIOINFORMATICS PROTEIN DATA BANK. **3D structures, 1EIN, download files, PDB format**. [Piscataway, New Jersey]: RCSB PDB, 20 Dec. 2000. Disponível em: <https://www.rcsb.org/structure/1EIN>. Acesso em: 27 nov. 2023

RENCORET, Jorge *et al.* Variability in lignin composition and structure in cell walls of different parts of macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 138–153, Dec. 2018.

RODRIGUES, Caroline Varella *et al.* Biosistemas integrados na codigestão do glicerol bruto em resíduos agroindustriais para a geração de H₂ e CH₄. **Matéria** (Rio de Janeiro), v. 26, n. 2, 2021.

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

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Yeimy A.; ORREGO, Carlos E. Immobilization of enzymes and cells on lignocellulosic materials. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 3, p. 787–806, Mar. 2020.

SABI, Guilherme J. *et al.* Decyl esters production from soybean-based oils catalyzed by lipase immobilized on differently functionalized rice husk silica and their characterization as potential biolubricants. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 157, p. 110019, June 2022.

SARMAH, Nipon *et al.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology Progress**, v. 34, n. 1, p. 5–28, Dec. 2018.

SEDGHI, Reza *et al.* Turning biodiesel glycerol into oxygenated fuel additives and their effects on the behavior of internal combustion engines: A comprehensive systematic review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 167, Feb. 2022.

SHIRANI, Mahboube; GHAZIASKAR, Hassan S.; XU, Chunbao. Optimization of glycerol ketalization to produce solketal as biodiesel additive in a continuous reactor with subcritical acetone using Purolite® PD206 as catalyst. **Fuel Processing Technology**, v. 124, p. 206–211, Aug. 2014.

SOUSA, Ronaldo Rodrigues *et al.* Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives. **Catalysis Science and Technology**, v. 11, n. 17, p. 5696–5711, Sept. 2021.

SOUZA, José E.S. *et al.* Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, p. 1–10, May 2020.

STATISTA. **Soybean oil consumption in Brazil from 2010/11 to 2022/23**. [S.l.]: Statista, 2022. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/1006428/soybean-oil-consumption-brazil/#statisticContainer>. Acesso em: 15 jun. 2024.

STATISTA. **Vegetable oil production worldwide 2000/01- 2023/24**. [S.l.]: Statista, 2024. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/263978/global-vegetable-oil-production-since2000-2001/>. Acesso em: 08 jul. 2024a.

STATISTA. **Soybean production in Brazil from crop year 2010/11 to 2023/24**. [S.l.]: Statista, 2024. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/741384/soybean-production-volume-brazil/>. Acesso em: 15 jun. 2024b.

STATISTA. **Soybean oil consumption in Brazil from 2010/11 to 2022/23**. [S.l.]: Statista, 2022. Disponível em: <https://www.statista.com/statistics/1006428/soybean-oil-consumption-brazil/#statisticContainer>. Acesso em: 15 jun. 2024.

SULISTYO, Hary *et al.* Solketal production by glycerol acetalization using Amberlyst-15 catalyst. **ASEAN Journal of Chemical Engineering**, v. 20, n. 1, p. 67–76, Jun. 2020.

TAVARES, F. *et al.* Rapid enzymatic hydrolysis of crambe oil catalyzed by castor seeds lipases. **Industrial Crops and Products**, v. 171, n. March, p. 113890, Nov. 2021.

THANGARAJ, Baskar; SOLOMON, Pravin Raj. Immobilization of lipases – a review. Part II: Carrier Materials. **ChemBioEng Reviews**, v. 6, n. 5, p. 167–194, Oct. 2019.

ZAHID, Imtisal *et al.* Production of fuel additive solketal via catalytic conversion of biodiesel-derived glycerol. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 59, n. 48, p. 20961–20978, Nov. 2020.

ZAHIRINEJAD, Sahar *et al.* Nano-organic supports for enzyme immobilization: scopes and perspectives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 204, p. 111774, Apr. 2021.

ZUCCA, Paolo; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; SANJUST, Enrico. Agarose and its derivatives as supports for enzyme immobilization. **Molecules**, v. 21, n. 11, p. 1–25, Nov. 2016.