



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. UNIFAL-MG
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG.
CEP 37130-000 Fone: (35) 3299-1000.
Fax: (35) 3299-1063



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

FERNANDA ROCHA MATTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
ÉSTERES MONOALQUÍLICOS EPOXIDADOS A PARTIR DE MATÉRIAS-
PRIMAS RENOVÁVEIS**

ALFENAS/MG

2024

FERNANDA ROCHA MATTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
ÉSTERES MONOALQUÍLICOS EPOXIDADOS A PARTIR DE MATÉRIAS-
PRIMAS RENOVÁVEIS**

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

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes
Coorientador: Prof. Dr. Washington Azevêdo da Silva

ALFENAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central

Rocha Mattos, Fernanda.

Desenvolvimento de um novo processo para a produção de ésteres monoalquílicos epoxidados a partir de matérias-primas renováveis / Fernanda Rocha Mattos. - Alfenas, MG, 2024.

64 f. : il. -

Orientador(a): Adriano Aguiar Mendes.

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

Bibliografia.

1. Matérias-primas renováveis. 2. Óleo de soja usado. 3. Óleo fúsel. 4. Epoxidação. 5. Ésteres monoalquílicos. I. Aguiar Mendes, Adriano, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

FERNANDA ROCHA MATTOS

**DESENVOLVIMENTO DE UM NOVO PROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE
ÉSTERES MONOALQUÍLICOS EPOXIDADOS A PARTIR DE MATÉRIAS-
PRIMAS RENOVÁVEIS**

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

Aprovada em: 22 de março de 2024.

Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

Profa. Dra. Ana Karine Furtado de Carvalho

Instituição: Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP)

Prof. Dr. Marcelo Franco

Instituição: Universidade Federal de Santa Cruz (UESC)



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Aguiar Mendes, Presidente**, em 22/03/2024, às 17:46, 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 **1217086** e o código CRC **C423F2F7**.

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mais profunda gratidão. Em especial à minha mãe Elaine, por ter sido minha fonte de inspiração, encorajamento e apoio incondicional. Sem o seu amor e apoio, essa conquista não teria sido possível. Aos meus amigos, quero agradecer por estarem ao meu lado em momentos de conquistas e felicidade, mas também nos desafios e nas dificuldades. Vocês foram essenciais durante toda essa jornada, cada um à sua maneira, e por isso serei eternamente grata. Ao Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes, na qual mais do que um orientador, foi um mentor e um grande amigo. Obrigado por compartilhar sua sabedoria, pela paciência e por me incentivar a dar o meu melhor em cada etapa. Obrigada por acreditar tanto em mim e por abrir tantas portas no meu caminho. Te admiro como profissional mas acima de tudo, como pessoa. Aos meus colegas de laboratório, Guilherme e Miguel, não tenho nem palavras para agradecer tudo que fizeram por mim. Fomos uma família e isso jamais será apagado da minha memória, vocês sempre terão um lugar especial no meu coração. Meus parceiros de laboratório, de festa e de bar, mas acima de tudo, meu amigos queridos. Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGBiotec), a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) pela oportunidade de realizar o presente trabalho e à FAPEMIG pela concessão da bolsa.

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

Os autores também agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-01691-21) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (Processo PQ-2 CA EQ 310633/2020-6) pelo suporte financeiro.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi produzir ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE), uma valiosa classe de oleoquímicos utilizados em uma ampla gama de produtos e indústrias, a partir de óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel por um processo de três etapas. Este processo consiste na primeira hidrólise enzimática do OSU para produzir ácidos graxos livres (AGL). Nesta etapa, cinco lipases microbianas com diferentes especificidades foram testadas como biocatalisadores. A hidrólise completa do OSU foi obtida após 3 h de reação sob agitação vigorosa (1500 rpm) usando uma lipase não específica de *Candida rugosa* (LCR). Posteriormente, a produção de ésteres monoalquílicos (EMA) via esterificação de AGL e óleo fúsel em um sistema isento de solventes foi conduzida usando lipase Eversa[®] Transform 2.0 (ET 2.0) imobilizada via adsorção física em esferas de poli(estireno-divinilbenzeno) como biocatalisador. Diferentes estratégias de remoção de água (reatores fechados e abertos na presença ou ausência de peneiras moleculares a 5% m.m⁻¹) na reação foram avaliadas. A conversão máxima de AGL foi de 64,3 ± 2,3% (reator aberto após 30 min de reação) e 73,5 ± 0,4% (reator fechado após 45 min de reação) foi alcançada a 40°C usando uma razão molar estequiométrica AGL:óleo fúsel (1:1), ausência de peneiras moleculares e 5 mg de proteína imobilizada por grama de mistura reacional. Nestes experimentos, a conversão máxima de AGL foi de apenas 30,2 ± 2,7% após 210 min de reação em reator fechado usando lipase solúvel. Testes de reuso revelaram melhor retenção da atividade inicial da ET2.0 imobilizada (cerca de 82%) após oito reações sucessivas de esterificação em batelada conduzidas em reator aberto. Finalmente, os EMA produzidos foram epoxidados via reação de Prilezhaev, um processo químico clássico de epoxidação, usando peróxido de hidrogênio e ácido fórmico como catalisador homogêneo. Os produtos foram identificados por ressonância magnética nuclear de prótons (¹H RMN). A conversão máxima de ligações insaturadas em grupos epóxi foi em torno de 33%, alcançada usando ambos os EMA produzidos (reatores abertos ou fechados). Estes resultados mostram que este novo processo pode ser uma abordagem promissora para a produção de oleoquímicos de valor agregado a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo.

Palavras-chave: Ésteres monoalquílicos epoxidados; Óleo de soja usado; Óleo fúsel.

ABSTRACT

The aim of this study was to produce epoxidized monoalkyl esters (EMAE), a valuable class of oleochemicals used in a wide range of products and industries, from used soybean cooking oil (USCO) and fusel oil by a chemoenzymatic three-step process. This process proceeds via first enzymatic hydrolysis of USCO to produce free fatty acids (FFA). In this step, five microbial lipases with different specificities were tested as biocatalysts. Full hydrolysis of USCO was obtained after 3 h of reaction under vigorous stirring (1500 rpm) using a non-specific lipase from *Candida rugosa* (CRL). Afterwards, monoalkyl esters (MAE) production via esterification of FFA and fusel oil in a solvent-free system was conducted using lipase Eversa[®] Transform 2.0 (ET 2.0) immobilized via physical adsorption on poly(styrene-divinylbenzene) (PSty-DVB) beads as biocatalyst. Different water removal strategies (closed and open reactors in the presence or absence of molecular sieves at 5% m.m⁻¹) on the reaction were evaluated. Maximum FFA conversion around of 64.3 ± 2.3% (open reactor after 30 min of reaction) and 73.5 ± 0.4% (closed reactor after 45 min of reaction) was achieved at 40 °C using a stoichiometric FFA:fusel oil molar ratio (1:1), absence of molecular sieves and 5 mg of immobilized protein per gram of reaction mixture. Under such conditions, maximum FFA conversion was only of 30.2 ± 2.7% after 210 min of reaction in closed reactor using soluble lipase. Reusability tests revealed better retention of the original activity of immobilized ET2.0 (around of 82%) after eight successive batch esterification reactions conducted in an open reactor. Finally, the produced MAE were epoxidized via Prilezhaev reaction, a classical chemical epoxidation process, using hydrogen peroxide and formic acid as a homogeneous catalyst. The products were characterized by standard methods and identified by proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR). Maximum conversion of unsaturated bonds into epoxy groups around of 33%, with an experimental epoxy oxygen content (OOC_{exp.}) of 1.75-1.78% and selectivity (S) of 0.81, was achieved using both produced MAE (open or closed reactors). These results show that this new process can be a promising approach for value-added oleochemicals production from low-cost and renewable raw materials.

Keywords: Epoxidized monoalkyl esters; Used soybean cooking oil; Fusel oil.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura química de um ácido graxo livre (AGL) e de um éster monoalquílico (EMA).....14
- Figura 2 - Esquema de imobilização por ativação interfacial em suporte hidrofóbico.....21
- Figura 3 - Diagrama ilustrando os principais métodos de imobilização de enzimas.....22
- Figura 4 - Mecanismo de epoxidação por perácidos.....26
- Figura 5 - Influência do tempo de reação na porcentagem de hidrólise de OSU catalisada por lipases microbianas com diferentes especificidades: LCR (*Candida rugosa*), ET2.0 (*Thermomyces lanuginosus*), CALA (*Candida* sp.), LAN (*Aspergillus niger*), LRJ (*Rhizopus javanicus*) e uma mistura ET2.0 + CALA. As reações foram conduzidas na ausência de emulsificantes e agentes tampão, utilizando-se uma relação óleo:água mássica de 40%, agitação mecânica contínua (1500 rpm), 40°C e carregamento inicial de lipase de 50 U por grama de mistura reacional.....44
- Figura 6 - Influência do tempo de reação na produção de EMA e m sistemas isentos de solventes catalisados por ET2.0 solúvel ou imobilizada em esferas de PSty-DBV utilizando diferentes estratégias de remoção de água. As reações foram a 40°C, 240 rpm, razão estequiométrica AGL:óleo fúsel (1:1) e concentração proteica de 5 mg.g⁻¹ da mistura reacional.....46
- Figura 7 - Testes de reuso após sucessivas reações de esterificação de AGL de OSU e óleo fúsel conduzidos em reator fechado e aberto catalisada por ET2.0 imobilizado em esferas PSty-DVB. As reações foram a 40°C, 240 rpm, razão estequiométrica AGL:óleo fúsel (1:1) e concentração proteica de 5 mg.g⁻¹ da mistura reacional.....48
- Figura 8 - Fotografia das amostras de óleo de soja usado (OSU ou USCO em inglês), ésteres monoalquílicos (EMA ou MAE em inglês) e ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) para a etapa de esterificação (produção de EMA) realizada em reator aberto (A) e fechado (B).....50

Figura 9 - Espectros de ^1H NMR de óleo fúsel, óleo de soja usado (OSU) e seus derivados – ácidos graxos livres (AGL), ésteres monoalquílicos (EMA) e ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE).....	52
Figura 10 - Esquema ilustrativo da produção de ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) a partir de óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel por um processo de três etapas.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa da produtividade para a produção enzimática de ésteres monoalquílicos catalisados por ET2.0 solúvel ou imobilizada em esferas de PSty-DBV utilizando diferentes estratégias de remoção de água.....	47
Tabela 2 - Propriedades químicas do óleo de soja usado (OSU), ésteres monoalquílicos (EMA) e ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) produzidos.....	49
Tabela 3 - Propriedades das lipases microbianas utilizadas neste estudo.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

OSU	Óleo de soja usado
OVE	Óleos vegetais epoxidados
EMA	Ésteres monoalquílicos
EMAE	Ésteres monoalquílicos epoxidados
EAGE	Ésteres de ácidos graxos epoxidados
AGL	Ácidos graxos livres
AGE	Ácidos graxos epoxidados
LCR	Lipase de <i>Candida rugosa</i>
CALA	Lipase de <i>Candida</i> sp.
LRJ	Lipase de <i>Rhizopus japonicus</i>
LAN	Lipase de <i>Aspergillus niger</i>
ET 2.0	Eversa [®] Transform 2.0
OD	Oxigênio dissolvido
DDOs	Destilados de desodorização
DAG	Diacilgliceróis
TAG	Triacilgliceróis
2-MAG	2-monoacilglicerol
¹H RMN/¹H NMR	Ressonância Magnética Nuclear de Prótons
PSty-DVB	Poli(estireno-divinilbenzeno)
PVC	Policloreto de vinila
OOC_{teor.}	Porcentagem teórica máxima de oxigênio
OOC_{exp.}	Porcentagem experimental máxima de oxigênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	ÓLEO DE COZINHA USADO E ÓLEO FÚSEL: MATÉRIAS-PRIMAS RENOVÁVEIS E DE BAIXO CUSTO	17
3.2	LIPASES E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	19
3.3	HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA	23
3.4	EPOXIDAÇÃO	25
3.4.1	<i>MATÉRIAS-PRIMAS PARA PROCESSOS EPOXIDATIVOS: ÓLEOS VEGETAIS E ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS.....</i>	26
3.4.2	<i>PROCESSOS EMPREGADOS NA OBTENÇÃO DE ÓLEOS E ÉSTERES EPOXIDADOS</i>	28
3.4.3	<i>ÓLEOS VEGETAIS EPOXIDADOS E SEUS DERIVADOS: APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS.....</i>	29
4	ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “CATALYSTS” (DOI - https://doi.org/10.3390/catal13030543).....	31
4.1	INTRODUÇÃO.....	31
4.2	MATERIAS E MÉTODOS	34
4.2.1	<i>Materiais.....</i>	34
4.2.2	<i>Desidratação do óleo fúsel.....</i>	35
4.2.3	<i>Hidrólise enzimática do OSU: Triagem de preparações de lipase.....</i>	35
4.2.4	<i>Imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 via adsorção física em esferas PSty-DVB.....</i>	36
4.2.5	<i>Procedimento geral para a esterificação enzimática de AGL e óleo fúsel num sistema isento de solventes</i>	37
4.2.6	<i>Ensaio de reuso do biocatalisador.....</i>	38
4.2.7	<i>Procedimento geral para a epoxidação in situ de ésteres monoalquílicos provenientes do OSU e do óleo fúsel.....</i>	39
4.2.8	<i>Métodos analíticos.....</i>	39
4.2.8.1	<i>Índice de iodo (II).....</i>	39

4.2.8.2	Porcentagem relativa de conversão das ligações duplas	40
4.2.8.3	Índice de acidez (IA)	40
4.2.8.4	Porcentagem teórica máxima de oxigênio ($OOC_{teor.}$)	40
4.2.8.5	Porcentagem experimental máxima de oxigênio ($OOC_{exp.}$).....	41
4.2.8.6	Porcentagem relativa de conversão em oxirano (ROC)	41
4.2.8.7	Selectividade (S).....	42
4.2.9	<i>Análise de 1H RMN</i>	42
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.3.1	<i>Produção de AGL por hidrólise enzimática do OSU: Triagem de fontes de lipase</i>	42
4.3.2	<i>Desempenho comparativo da lipase solúvel ou imobilizada ET2.0 na produção de EMA via esterificação em sistemas isentos de solventes orgânicos</i>	44
4.3.3	<i>Estudos de reuso do biocatalisador</i>	47
4.3.4	<i>Epoxidação in situ de ésteres monoalquílicos</i>	48
4.3.5	<i>Análise de 1H RMN</i>	50
4.4	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
	REFERÊNCIAS	61

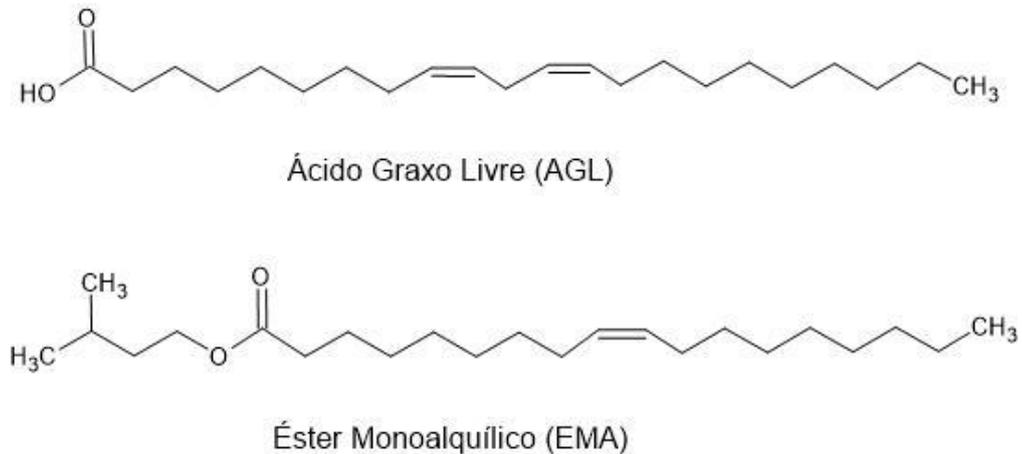
1 INTRODUÇÃO

Durante anos, houve uma dependência mundial de combustíveis fósseis (gás natural, petróleo e carvão) como fontes de energia para atividades residenciais ou como matérias-primas não renováveis na produção de bens comerciais e produtos industriais (Jiang *et al.*, 2022). No entanto, o uso contínuo e exploração excessiva desses recursos naturais acarretaram não apenas em poluição ambiental, mas também contribuiu significativamente para as mudanças climáticas e o aquecimento global. Diante desse cenário, esforços têm sido realizados para mitigar as emissões de poluentes e reduzir contaminações ao ecossistema por meio da utilização de fontes de energia alternativas e matérias-primas renováveis (Berenblyum *et al.*, 2016; Jiang *et al.*, 2022). A aplicação de matérias-primas renováveis está intrinsecamente relacionada ao valor das reservas mundiais comprovadas de petróleo e seu custo no mercado global. Óleos e gorduras vegetais emergem como uma das categorias promissoras de matérias-primas renováveis. Produtos químicos de alto valor como biocombustíveis, olefinas superiores e álcoois graxos superiores podem ser obtidos por estes materiais (Berenblyum *et al.*, 2016). Estes, podem ser extraído de diversas fontes vegetais, como soja, girassol, canola e dendê (Souza *et al.*, 2009).

Modificações químicas são amplamente utilizadas na obtenção de produtos de alto valor em indústrias oleoquímicas, como processos de hidrólise e esterificação do óleo vegetal. Na hidrólise, são obtidos ácidos graxos livres (AGL) e glicerol pela reação do óleo com água, na presença de um catalisador (Zenevicz *et al.*, 2016). A esterificação envolve a reação dos ácidos graxos com um álcool, obtendo-se um novo éster (Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.*, 2022; Salihu *et al.*, 2012). A Figura 1 ilustra a estrutura química de um AGL (ácido linoléico), assim como de um éster monoalquílico (EMA). O óleo fúsel (também conhecido como álcool fúsel) vem sendo explorado em processos de esterificação junto com óleos vegetais (Dias *et al.*, 2018). Catalisadores podem ser utilizados para acelerar essa reação, porém, visto que grande parte dos catalisadores ácidos necessitam de condições de reações mais rigorosas (altas temperaturas e pressão) e podem ser altamente corrosivos, a esterificação enzimática é uma alternativa viável (Aguieiras *et al.*, 2013). A enzima se liga ao substrato (ácido carboxílico e álcool) e promove a hidrólise da ligação entre o grupo carboxila do ácido e o grupo hidroxila do álcool, formando uma nova ligação éster entre esses grupos (Guedes Júnior *et al.*, 2022). A esterificação enzimática apresenta diversas vantagens em relação aos métodos convencionais, já que as enzimas são altamente seletivas e podem direcionar a formação do éster desejado, evitando a

formação de subprodutos indesejados. Além disso, a esterificação enzimática pode ser realizada em condições mais suaves de temperatura e pressão (resultando em menor consumo de energia) e empregar enzimas imobilizadas, permitindo seu reuso (Guedes júnior *et al.*, 2022; Salihu *et al.*, 2012).

Figura 1 - Estrutura química de um ácido graxo livre (AGL) e de um éster monoalquílico (EMA).



Fonte: Do autor.

Além da esterificação, o óleo vegetal pode passar por uma etapa adicional, a epoxidação. A epoxidação também é um processo de modificação química, na qual os grupos insaturados presentes no óleo vegetal são transformados em grupos epóxi (Saurabh *et al.*, 2011). Essa modificação leva à formação de compostos epoxidados, na qual possuem propriedades químicas e físicas distintas em relação ao óleo vegetal original (Wang; Zhao; Liu, 2018). Existem diversos métodos para realizar a epoxidação do óleo vegetal e seus derivados (ésteres monoalquílicos e ácidos graxos), sendo os mais comuns o uso de perácidos, como por exemplo ácido peracético e ácido perfórmico, como agentes oxidantes (Zhang *et al.*, 2019). Esses agentes oxidantes reagem com a dupla ligação do ácido graxo em presença de um catalisador, facilitando a adição do grupo oxirano (anel de três átomos de carbono) à dupla ligação (Wang; Zhao; Liu, 2018; Saurabh *et al.*, 2011). A epoxidação pode ser conduzida visando alcançar uma conversão máxima (rendimento epóxi) ou pode ser empregada visando obter o produto de maneira mais econômica, buscando uma taxa de conversão mais elevada, mas não necessariamente a máxima conversão possível (Zhang *et al.*, 2019).

A composição dos ácidos graxos presentes nos óleos vegetais desempenha um papel fundamental não só do ponto de vista nutricional mas também industrial, principalmente em

relação a sua aplicabilidade. Os processos de modificação química permitem a substituição de produtos derivados do petróleo por produtos derivados de óleos vegetais, como por exemplo, o óleo de soja usado (OSU), um resíduo de fácil obtenção e baixo custo (Jadhav *et al.*, 2021). A epoxidação proporciona a formação de novos grupos reativos com propriedades vantajosas que podem ser amplamente utilizados em diversas aplicações (Cai *et al.*, 2022; Jadhav *et al.*, 2021). Os epóxidos derivados de olefinas são considerados intermediários valiosos devido à sua alta reatividade no anel oxirano, permitindo sua conversão em uma ampla variedade de compostos, como álcoois, polímeros, compostos olefinicos, alcanolaminas, compostos carbonílicos e glicóis (Jadhav *et al.*, 2021). A epoxidação de derivados de ácidos graxos insaturados resulta em produtos versáteis e de grande importância comercial. O OSU epoxidado possui aplicação como plastificante ativo à base de óleo vegetal, apresentando baixo custo, renovabilidade e degradabilidade (Ge; Dou, 2022). Além disso, os óleos vegetais epoxidados também são amplamente utilizados como intermediários para a preparação de lubrificantes, polióis e poliuretanos (Cai *et al.*, 2022).

O objetivo deste estudo foi produzir ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) a partir de óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel por meio de um processo de três etapas. O processo envolveu a hidrólise do OSU para obter ácidos graxos livres (AGL), seguida da esterificação do AGL com óleo fúsel e a epoxidação dos ésteres monoalquílicos gerados *in situ*. Cinco tipos de lipases com diferentes especificidades foram utilizadas para a hidrólise do OSU e a esterificação foi realizada em um sistema isento de solventes orgânicos. Estratégias de remoção de água foram aplicadas para aumentar a produção de ésteres. A lipase ET2.0 foi imobilizada em esferas de poli(estireno-divinilbenzeno) e realizados testes para comparar a eficiência catalítica do biocatalisador heterogêneo com a forma solúvel da lipase. A epoxidação dos EMA foi realizada por meio da epoxidação de Prilezhaev, a partir da reação de ácido fórmico e peróxido de hidrogênio em fase aquosa. Os produtos (EMA e EMAE) foram identificados e caracterizados por análise de RMN de prótons. Este é o primeiro estudo a investigar a produção de EMAE a partir de OSU e óleo fúsel (matérias-primas renováveis) em um processo de três etapas.

2 OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi produzir ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE), uma valiosa classe de oleoquímicos utilizados em uma ampla gama de produtos e indústrias, a partir de óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel por um processo de três etapas, sendo:

- a) hidrólise completa do OSU para produção de ácidos graxos livres (AGL), testando cinco tipos de lipases com diferentes especificidades: lipase de *Candida rugosa* (LCR - comercial); lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzido por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (ET2.0 - comercial); lipase de *Candida* sp. (CALA - comercial); lipase de *Rhizopus japonicus* (LRJ - não comercial); e lipase de *Aspergillus niger* (LAN - não comercial);
- b) esterificação do AGL com óleo fúsel, em reator aberto e fechado, com e na ausência de peneiras moleculares;
- c) epoxidação dos ésteres monoalquílicos (EMA) produzidos *in situ*, a partir da reação de ácido fórmico e peróxido de hidrogênio, gerando ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEO DE COZINHA USADO E ÓLEO FÚSEL: MATÉRIAS-PRIMAS RENOVÁVEIS E DE BAIXO CUSTO

O óleo de cozinha usado nas indústrias alimentícias é prioritariamente reaproveitado por motivos econômicos, porém, esse reaproveitamento leva à oxidação do óleo (devido à dissolução do oxigênio no óleo durante as frituras repetidas) resultando em diferentes produtos de oxidação (Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.*, 2022). Anualmente, mais de 15 milhões de toneladas desses resíduos são produzidos pelas indústrias de alimentos e cozinhas domésticas, sendo descartados de forma convencional em aterros sanitários ou no sistema de esgoto (Binhayeeding *et al.*, 2020). Ambas as formas de descarte apresentam consequências negativas para o meio ambiente. O descarte em aterros pode poluir os recursos hídricos e do solo, perturbando o ecossistema, enquanto o descarte no sistema de esgoto pode causar obstruções e danos aos canos, acarretando em custos econômicos e ambientais. Além disso, o óleo de cozinha usado tem baixa solubilidade em água, o que pode afetar negativamente a flora e fauna aquáticas, reduzindo os níveis de oxigênio dissolvido (OD) e limitando a penetração da luz solar na água (Yang; Zhang, 2019). Ademais, o descarte inadequado desse resíduo pode levar à proliferação de ratos e vermes, representando riscos para a saúde humana (Hosseinzadeh-Bandbafha *et al.*, 2022). Com a intenção de reverter esse problema, diversas estratégias têm sido propostas, incluindo a utilização de óleo de soja usado (OSU) como matéria-prima na geração de produtos de interesse industrial. Os ácidos graxos livres (AGL), obtidos a partir da hidrólise do OSU, possuem diversas aplicações, como por exemplo sabões, surfactantes, lubrificantes e plastificantes (Baena *et al.*, 2022). Essas aplicações destacam o potencial tecnológico desse resíduo como fonte de matéria-prima renovável, reduzindo o impacto ambiental causado pelo seu descarte inadequado (Mannu *et al.*, 2020).

O óleo fúsel, um subproduto gerado na produção de álcool etílico, resultante da fermentação e destilação da biomassa, também vem ganhando destaque como matéria-prima renovável e de baixo custo (Dias *et al.*, 2018). Trata-se de uma mistura de álcoois superiores composto por três ou mais átomos de carbono, na qual apresenta um ponto de ebulição entre 80 e 132°C (Wang *et al.*, 2015). Este, possui um potencial significativo de reaproveitamento devido à sua composição rica em álcoois superiores e ao alto volume gerado anualmente (120 milhões de litros) (Da silva *et al.*, 2020). O aproveitamento dos subprodutos é de grande relevância em países com alta produção de etanol, pois permite o reuso de materiais e contribui

para o aumento da eficiência econômica do processo. A produção de óleo fúsel possui uma alta concentração geográfica, sendo dominada por países específicos. Os Estados Unidos se destacam como o maior produtor mundial desse composto, contribuindo com mais da metade da produção global (54,36%). Em seguida, o Brasil ocupa a segunda posição, sendo responsável por cerca de 29,63% da produção global. No que diz respeito à União Europeia, a produção de óleo fúsel permaneceu estável em 2019, atingindo um volume de aproximadamente 27 milhões de litros. Por outro lado, a China ocupou a quarta posição no ranking, referente ao período de 2009 a 2019, com uma produção estimada em cerca de 17 milhões de litros (De Jesús Mendoza-Pedroza *et al.*, 2021). Pensando no seu reaproveitamento, o óleo fúsel possui diversas aplicações, incluindo a produção de álcoois superiores purificados por destilação simples ou fracionada, bem como a síntese de ésteres por meio de processos químicos ou biotecnológicos. Os principais componentes encontrados no óleo fúsel são o álcool isoamílico (78,2%), butanol (10,6%) e outros álcoois secundários (11,2%) (Da silva *et al.*, 2020).

A transformação de óleo fúsel em ésteres pode gerar diversos compostos de interesse industrial, como por exemplo plastificantes e compostos aromáticos (De Jesús Mendoza-Pedroza *et al.*, 2021; Dias *et al.*, 2018). Essa técnica envolve a remoção de impurezas presentes no óleo fúsel, seguida da sua transformação em ésteres por meio da reação com álcoois. Esses esteres possuem um potencial significativo para a criação de produtos de alto valor agregado, abrindo oportunidades para o aproveitamento comercial desse recurso e contribuindo para a sustentabilidade na indústria química (De Jesús Mendoza-Pedroza *et al.*, 2021). Como o óleo fúsel consiste em uma mistura de componentes com propriedades semelhantes, ele é formado por diversos azeótropos. A separação desses compostos é de grande importância, pois o valor de mercado do óleo fúsel está diretamente relacionado à quantidade de álcoois superiores presentes, principalmente o álcool isoamílico. Visto que o óleo fúsel possui um teor elevado de álcool isoamílico, variando de 57% a 79%, o mesmo se torna adequado para atuar como aceptor acílico em reações de transesterificação e esterificação. Além disso, o óleo fúsel pode ser utilizado como herbicida e fungicida, pois apresenta atividade antimicrobiana (Massa *et al.*, 2023). No entanto, a produção em escala industrial de ésteres derivados do óleo fúsel ainda é um desafio devido às dificuldades de isolamento dos compostos aromáticos, alto custo do processo e baixo rendimento obtido (López-Fernández *et al.*, 2022). Pensando em reverter esse problema, vem-se avaliando maneiras de purificar esse óleo de forma eficiente e econômica. Pesquisas anteriores avaliaram o equilíbrio de fases no processo de recuperação do álcool isoamílico a partir do óleo fúsel e mostraram que é viável obter esse álcool com alta pureza e a

um baixo custo utilizando uma coluna de parede divisória (Massa *et al.*, 2023). A utilização dessa coluna é considerada uma opção vantajosa para a destilação do óleo fúsel devido aos benefícios que proporciona em termos de redução do custo total anual em comparação com a destilação tradicional. Essa redução de custo pode estar relacionada à menor demanda de energia, à simplificação do processo e ao aumento da eficiência global do sistema (De Jesús Mendoza-Pedroza *et al.*, 2021).

A produção de óleo fúsel, durante o processo de fermentação do etanol, pode ser favorecida por alguns fatores específicos. Entre eles, está a fermentação com baixo teor de nitrogênio, o que significa uma quantidade limitada de nutrientes disponíveis para as leveduras. Esse ambiente nutricional restritivo pode levar a um desequilíbrio no metabolismo das leveduras, resultando em uma maior produção de óleo fúsel (López-Fernández *et al.*, 2022; Massa *et al.*, 2023). Além disso, longos períodos de fermentação e um intervalo prolongado entre a fermentação e a destilação também podem contribuir para a formação do óleo fúsel. Isso ocorre porque a prolongada exposição dos compostos fermentados ao calor e às condições anaeróbicas favorece a formação de subprodutos, incluindo o fúsel. No entanto, o controle das variáveis do processo, como temperatura, pH e concentração de nutrientes, pode auxiliar na seletividade das leveduras, promovendo uma maior produção de etanol e uma menor formação de óleo fúsel (Massa *et al.*, 2023). É importante mencionar que sua composição pode ser influenciada pela diversidade da matéria-prima utilizada na fermentação, bem como pelo processo de fermentação em si. Além disso, a etapa de purificação do etanol também desempenha um papel significativo na sua composição final, pois pode afetar a concentração e proporção dos compostos presentes (Da silva *et al.*, 2020; Massa *et al.*, 2023).

As lipases são enzimas amplamente utilizadas na síntese biocatalítica de ésteres a partir do óleo fúsel. A síntese química de ésteres empregando catalisadores homogêneos, como ácidos inorgânicos (HCl, H₂SO₄ e H₃PO₄), pode resultar na formação indesejável de produtos tóxicos, por outro lado, a síntese biocatalítica (na qual utiliza enzimas com propriedades quimio, regio e estereosseletivas) surge como uma alternativa ecologicamente correta (Da silva *et al.*, 2020). Além disso, a utilização de lipases imobilizadas permitem o seu reaproveitamento, reduzindo o custo do processo (Dias *et al.*, 2018).

3.2 LIPASES E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

As enzimas desempenham um papel fundamental nas vias biossintéticas, promovendo a regulação e otimização das funções celulares, e são amplamente empregadas como

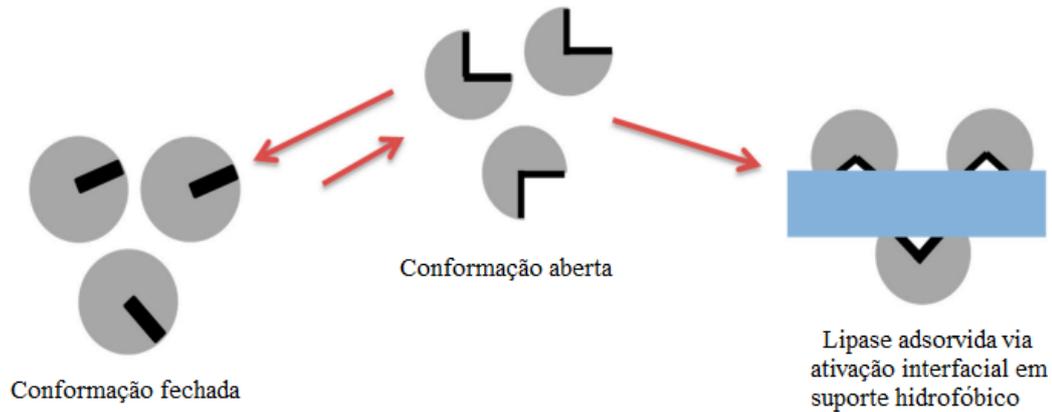
catalisadores, aumentando a velocidade de reações químicas (Katsimpouras; Stephanopoulos, 2021). A eficiência catalítica excepcional e a especificidade das enzimas as tornam agentes altamente atrativos para diversos processos biológicos (Ashjari *et al.*, 2020; Parandi *et al.*, 2023). As lipases (triacilglicerol hidrolase, EC 3.1.1.3) representam enzimas altamente versáteis, capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis (liberando ácidos graxos e glicerol) e a síntese de ésteres (produzindo ésteres de ácidos graxos e álcoois) através de reações de esterificação e transesterificação (Ben Bacha *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2013). Devido à sua notável eficiência como catalisadores industriais, essa classe enzimática possui uma ampla aplicação e abrange diversos setores, como os têxteis, indústria alimentícia, detergentes e medicamentos (Sun *et al.*, 2013). Além disso, as lipases têm sido amplamente empregadas na produção de ácidos graxos, gorduras modificadas, lipídios e ésteres ácidos (Parandi *et al.*, 2023; Sun *et al.*, 2013).

O avanço rápido da tecnologia enzimática tem gerado um grande interesse nas lipases microbianas. Essas enzimas são mais valiosas em comparação aos seus equivalentes de origem vegetal ou animal devido à sua ampla gama de atividades catalíticas, além da facilidade de manipulação genética, alta produtividade, ausência de variações sazonais, altas taxas de crescimento em meios economicamente viáveis e eficiência em escala laboratorial e industrial (Ben Bacha *et al.*, 2022; Parandi *et al.*, 2022). Diversas cepas bacterianas, como *Pseudomonas alcaligenes*, *P. aeruginosa*, *P. fragi*, *P. fluorescens* BJ-10, *Bacillus subtilis* e *B. nealsonii* S2MT, assim como diversos fungos, como *Penicillium expansum*, *P. chrysogenum* e *Trichoderma*, são conhecidos por sua capacidade de produzir lipases em quantidades significativas (Ben Bacha *et al.*, 2022).

Um aspecto único das lipases é seu mecanismo de ação conhecido como ativação interfacial. Na maioria dos sistemas homogêneos, as moléculas de lipase possuem uma cadeia polipeptídica que cobre o sítio ativo, denominada tampa, isolando-o do meio reacional durante sua forma fechada (Ashjari *et al.*, 2020; Parandi *et al.*, 2022). O sítio ativo das lipases contém resíduos de serina, aspartato ou glutamato e histidina. Quando as lipases entram em contato com superfícies hidrofóbicas, elas se adsorvem e fixam-se a essas superfícies, levando à exposição total do sítio ativo na forma aberta da lipase, como mostrado na Figura 1. Essa ativação interfacial resulta em um aumento da atividade enzimática. Em outras palavras, a presença de superfícies hidrofóbicas induz a movimentação da tampa, levando à forma aberta das lipases e, conseqüentemente, ao aumento da atividade catalítica (Parandi *et al.*, 2022). Essa capacidade de resposta das lipases a superfícies hidrofóbicas é explorada em diversas aplicações

industriais, onde a presença dessas superfícies estimula a atividade enzimática e melhora o desempenho das lipases como catalisadores (Ashjari *et al.*, 2020; Parandi *et al.*, 2022).

Figura 2 - Esquema de imobilização por ativação interfacial em suporte hidrofóbico.

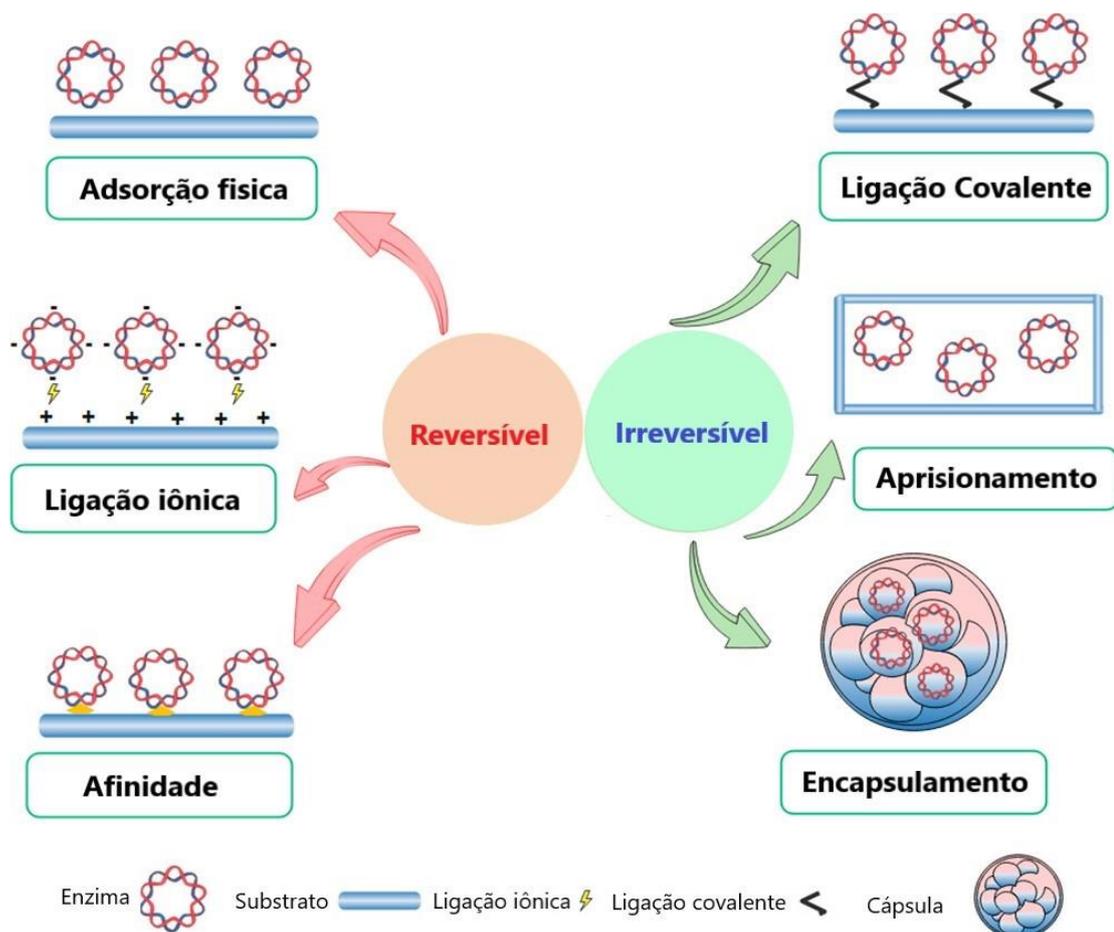


Fonte: Mokhtar *et al.*, 2020, p. 7.

No entanto, é importante ressaltar que existem alguns desafios relacionados à aplicação de lipases. Esses desafios incluem o alto custo das lipases, sua baixa estabilidade, taxa de reação reduzida e possibilidade de inativação. Uma abordagem frequentemente adotada para reduzir os custos é a reciclagem da enzima por meio de sua imobilização em um suporte sólido, criando um biocatalisador heterogêneo mais estável. Essa estratégia busca aumentar a vida útil da enzima, possibilitar seu reuso e otimizar a eficiência geral do processo (Ashjari *et al.*, 2020; López-Fernández *et al.*, 2022). Diversos métodos (Figura 3) têm sido empregados para imobilizar enzimas em suportes sólidos, incluindo adsorção física, ligações iônicas e ligações covalentes (Ashjari *et al.*, 2020). Na imobilização covalente, ocorre uma reação química entre os resíduos de aminoácidos ativos na superfície externa da enzima e os grupos funcionais ativos do suporte (Ashjari *et al.*, 2020; Parandi *et al.*, 2023). A formação de uma ligação forte entre a enzima e a matriz transportadora, juntamente com a alta meia-vida e estabilidade térmica da enzima, além da ampla gama de ligantes orgânicos disponíveis, são as vantagens desse método de imobilização (Ashjari *et al.*, 2020). Na adsorção física, a enzima se liga à superfície de um material, mantendo a conformação aberta da região da tampa. Isso permite a interação do sítio ativo da lipase com o substrato, facilitando a catálise de reações específicas (Rodrigues *et al.*, 2019). Esse fenômeno, conhecido como mecanismo de ativação interfacial, desempenha um papel essencial tanto na imobilização da lipase quanto na estabilização da enzima. A ativação interfacial em suportes hidrofóbicos tem sido amplamente investigada e documentada na

literatura científica. Esse mecanismo confere uma maior eficiência ao catalisador imobilizado, resultando em uma atividade catalítica aprimorada e uma maior estabilidade operacional do sistema enzimático (Ben Bacha *et al.*, 2022). Além disso, a ativação interfacial evita a formação de dímeros proteicos, que podem ocorrer quando as lipases estão em sua forma solúvel (Guedes Júnior *et al.*, 2022). Esses resultados ressaltam a importância desse mecanismo na otimização de sistemas enzimáticos para diversas aplicações industriais (Ben Bacha *et al.*, 2022; Guedes Júnior *et al.*, 2022; Rodrigues *et al.*, 2019).

Figura 3 - Diagrama ilustrando os principais métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Adaptada de Maghraby *et al.*, 2023, p. 5186.

Um dos aspectos vantajosos das reações de síntese de ésteres catalisadas por lipases imobilizadas é a possibilidade de conduzi-las em sistemas isento de solventes orgânicos, o que apresenta benefícios significativos em relação aos sistemas que utilizam esses solventes (Sun *et al.*, 2013; Parandi *et al.*, 2023). Esse tipo de sistema oferece maior segurança durante a produção em escala, além de contribuir para a redução de custos operacionais e preocupações

ambientais. Estudos anteriores mostraram resultados promissores ao converter eficientemente o óleo de coco e óleo fúsel em ésteres de ácido octanóico, empregando um sistema livre de solventes como meio reacional (Parandi *et al.*, 2022; Sun *et al.*, 2013). Essa abordagem tem demonstrado ser altamente viável e sustentável, mostrando-se como uma alternativa eficaz para a obtenção de ésteres de ácidos graxos a partir de fontes naturais de óleos vegetais (Sun *et al.*, 2013).

De fato, a imobilização de enzimas (como a lipase) tem-se mostrado uma alternativa promissora e ambientalmente amigável para catalisadores não biológicos na indústria química, biotecnológica e farmacêutica (Parandi *et al.*, 2022). Cada suporte pode conferir características específicas à enzima imobilizada, como estabilidade química e térmica, seletividade e atividade catalítica sob diferentes condições de reação. A imobilização de lipases em diferentes suportes permite superar as desvantagens associadas às enzimas livres, como instabilidade e impossibilidade de reuso, tornando-as mais atrativas para aplicações industriais de grande escala, com benefícios tanto econômicos quanto ambientais (Ben Bacha *et al.*, 2022; Parandi *et al.*, 2022; Parandi *et al.*, 2023).

3.3 HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA

A hidrólise de óleos e gorduras para a produção de ácidos graxos livres (AGL) e glicerol é de grande interesse industrial em diversas áreas, incluindo farmacêutica, alimentícia, química e cosmética (Souza *et al.*, 2020). O método convencional, conhecido como processo Colgate-Emery, envolve altas temperaturas (mínimo de 250°C) e pressões (50 bar), resultando em altos custos energéticos, reações indesejáveis (oxidação, desidratação e interesterificação dos triacilgliceróis) e formação de subprodutos (Ferreira *et al.*, 2019; Tavares *et al.*, 2021).

Uma alternativa promissora é a hidrólise enzimática utilizando lipases de origem microbiana, visto que possuem alta produtividade e são de fácil manipulação genética (Ben Bacha *et al.*, 2022). As lipases desempenham um papel importante nesse processo, realizando a hidrólise de óleos na presença de água, resultando na formação de AGL e glicerol (Souza *et al.*, 2020). Esses ácidos graxos livres têm sido amplamente utilizados como matéria-prima na produção de óleos químicos, álcoois, aminas e ésteres (Souza *et al.*, 2020). A hidrólise enzimática apresenta vantagens significativas em relação aos métodos convencionais, pois ocorre em condições suaves de pressão e temperatura, resultando em redução dos custos associados à energia e aos equipamentos, além de minimizar o tratamento de resíduos (Tavares *et al.*, 2021). A utilização de lipases com seletividade para ácidos graxos insaturados é

especialmente eficaz na hidrólise de óleos vegetais, como o óleo de soja, tornando o processo economicamente viável (Ferreira *et al.*, 2019).

A formação de emulsão é uma estratégia vantajosa para melhorar a taxa de reação na hidrólise enzimática de óleos vegetais. A reação ocorre na interface entre a fase aquosa e a fase orgânica, elevando a viscosidade e imiscibilidade dos substratos, na qual o fenômeno de transferência de massa controla a velocidade da reação. Portanto, aumentar a área de interface através da formação de uma emulsão pode melhorar a taxa de reação e facilitar o uso de biocatalisadores em escala industrial. (Tavares *et al.*, 2021).

Diversas pesquisas têm explorado o uso de matérias-primas de baixo custo com altos teores de ácidos graxos livres, como o óleo de soja usado (OSU), para produção de ésteres (Aguieiras; Souza; Langone, 2013). Aproveitar esses resíduos para a geração de coprodutos de maior valor agregado é de extrema importância para mitigar os impactos negativos do descarte no meio ambiente (Al-zuhair *et al.*, 2006). Os ácidos graxos livres (AGL) obtidos no processo de hidrólise do óleo vegetal podem ser submetidos a uma etapa adicional de esterificação, na qual ocorre uma nova ligação éster através da reação do AGL recém-criado com álcool. Essa reação pode ser catalisada por lipases em meios não aquosos ou microaquosos, visto que esses biocatalisadores são ideais para catalisar as reações de transesterificação dos triacilgliceróis e esterificação dos ácidos graxos livres presentes na matéria-prima (Souza *et al.*, 2009). Além de atuarem em condições reacionais suaves de temperatura e pressão, as lipases são altamente seletivas, o que resulta em menor formação de produtos secundários e efluentes (Ashjari *et al.*, 2020). Essa abordagem se destaca dos métodos convencionais que utilizam ácidos fortes como catalisadores, pois ela é mais eficiente e sustentável. Além disso, os processos tradicionais de esterificação com ácidos fortes consomem muita energia, envolvem manuseio de fluidos corrosivos e geram resíduos ácidos com impactos ambientais significativos (Sun *et al.*, 2013).

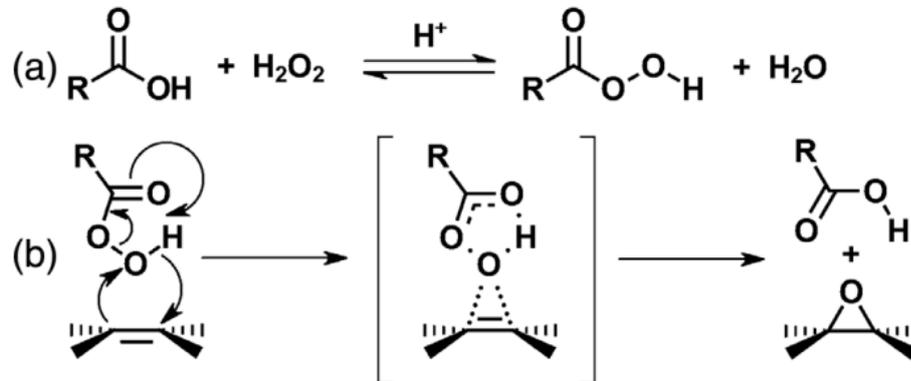
É importante ressaltar que a água desempenha um papel fundamental no processo de esterificação enzimática, influenciando tanto os aspectos termodinâmicos quanto cinéticos desse processo (Sousa *et al.*, 2021). Sendo assim, a adição em excesso de um dos materiais de partida assim como a remoção de moléculas de água é de grande importância para que haja um deslocamento do equilíbrio da reação para a produção de éster (Guedes Júnior *et al.*, 2022). O éster formado é sempre mais apolar que ambos os substratos e sua concentração aumenta ao longo do tempo de reação. Esse processo favorece a distribuição de água entre o meio reacional e a fase catalítica, aumentando a atividade hidrolítica das lipases. A utilização de suportes

hidrofóbicos também pode minimizar a formação de uma fase aquosa, favorecendo o processo de esterificação (Guedes Júnior *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2021).

3.4 EPOXIDAÇÃO

A epoxidação de óleos vegetais e seus derivados (ésteres e ácidos graxos) é um processo versátil e amplamente utilizado na indústria para a introdução de grupos epóxidos nos ácidos graxos insaturados presentes nesses óleos (Xia *et al.*, 2010). Existem diferentes rotas e métodos para realizar essa epoxidação, sendo o método convencional baseado na formação de perácidos, na qual geralmente requerem a utilização de catalisadores (Milchert; Malarczyk; Kłos, 2015; Suzuki *et al.*, 2018). Esses catalisadores são responsáveis pela geração *in situ* do perácido, o qual é fundamental para a formação dos anéis oxirânicos (epóxidos) a partir das ligações duplas presentes nos triacilgliceróis dos óleos. Os ácidos orgânicos mais comuns na formação do perácido são o ácido acético e o ácido fórmico (Suzuki *et al.*, 2018). A epoxidação dos ácidos graxos insaturados e de seus ésteres (provenientes da hidrólise e esterificação do óleo) pode ser realizada pelo método de Prileshajev, onde o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é utilizado como doador de oxigênio (Zhang *et al.*, 2017). O mecanismo de formação do perácido envolve a atuação do próton de hidrogênio como um ativador do ácido carboxílico no ácido orgânico. Essa ativação é seguida pela adição do H_2O_2 e pela perda simultânea de uma molécula de água. Na etapa subsequente da reação de epoxidação, o grupo peroxi (-COOOH) age como um transportador de oxigênio, levando à formação do anel oxirano no ácido graxo insaturado esterificado ao esqueleto de glicerol, como mostrado na Figura 2 (Suzuki *et al.*, 2018). No entanto, a presença de ácidos fortes pode levar a reações secundárias indesejadas, como instabilidade do anel epóxido, o que pode resultar na sua abertura e perda da funcionalidade desejada (Wang; Zhao; Liu, 2018; Zhang *et al.*, 2017). Além disso, mesmo na ausência de um catalisador ácido, a formação do perácido ainda pode ocorrer, uma vez que o ácido orgânico pode dissociar um íon de hidrogênio, o qual pode promover a reação de epoxidação de maneira adicional (Suzuki *et al.*, 2018).

Figura 4 - Mecanismo de epoxidação por perácidos.



Fonte: Moser *et al.*, 2020, p. 4 (esta ilustração foi adaptada com permissão de Journal of the American Oil Chemists' Society, ON: 5595571055293).

Legenda: (a) conversão de equilíbrio de ácido carboxílico em perácido via oxidação por H_2O_2 ;
(b) epoxidação do alceno com o perácido, levando a formação do anel oxirano.

Em muitos processos de epoxidação, a conversão do oxirano é reduzida devido à conversão do produto epóxido em produtos de clivagem (dióis). Através do controle das condições do processo, é possível obter um rendimento máximo de epóxido. Em escalas industriais, a síntese de óleos epoxidados é geralmente realizada em reatores de batelada utilizando peróxido de hidrogênio e ácido fórmico, com um tempo de reação de aproximadamente 8h (Jadhav *et al.*, 2021). A utilização de ácido fórmico permite que a epoxidação possa ocorrer sem a adição de catalisadores externos, devido à acidez relativamente alta do ácido, que pode autocatalisar a formação do ácido perfórmico (Bai *et al.*, 2020). Porém, é importante ressaltar que o ácido fórmico é mais reativo do que o ácido acético quando se trata de transferir ligações duplas lipídicas para anéis epóxi, no entanto, também é mais corrosivo (Jadhav *et al.*, 2021). Sendo assim, a epoxidação autocatalisada do ácido fórmico a partir de óleos vegetais ou de ésteres de ácidos graxos pode ser uma abordagem promissora para aplicação industrial, visto que não há necessidade de descarte dos ácidos minerais após o processo e também pela facilidade de recuperação do ácido fórmico por destilação (Bai *et al.*, 2020; Jadhav *et al.*, 2021).

3.4.1 MATÉRIAS-PRIMAS PARA PROCESSOS EPOXIDATIVOS: ÓLEOS VEGETAIS E ÉSTERES DE ÁCIDOS GRAXOS

O processo de epoxidação das insaturações presentes nos óleos vegetais e seus derivados permite sintetizar produtos com propriedades aprimoradas devido à alta reatividade do anel

oxirano (Gorla *et al.*, 2013). Os óleos vegetais epoxidados (OVEs) e seus ésteres de ácidos graxos epoxidados (EAGE) são de grande interesse industrial pois são considerados matérias-primas biorrenováveis, o que é de grande relevância no desenvolvimento de produtos químicos ecológicos e biodegradáveis (Musik *et al.*, 2021).

Os OVEs podem ser obtidos tanto de fontes naturais como por meio de síntese. Os ácidos graxos epoxidados (AGEs) de origem natural estão presentes em triglicerídeos encontrados em mais de 60 espécies pertencentes a 12 famílias de plantas. Entre eles, o ácido vernólico é o mais abundante, encontrado principalmente nos óleos das sementes de *Vernonia galamensis* e *Euphorbia lagascae*, com teores de até 65% e 80% em massa, respectivamente. Outro AGE de relevância é o ácido coronárico, presente em até 16% em massa no óleo das sementes de *Chrysanthemum coronarium*. No entanto, os demais AGEs naturais não excedem 5% em massa do conteúdo de óleo da planta de origem. Apesar da existência de OVEs de ocorrência natural, as plantas das quais são derivados não são cultivadas em escala comercialmente significativa. Portanto, os OVEs utilizados em aplicações industriais são quase exclusivamente obtidos por meio da epoxidação de óleos básicos (Moser *et al.*, 2022).

A epoxidação química de óleos vegetais, como soja, linhaça e colza, tem sido amplamente utilizada em escala industrial (Lu *et al.*, 2010). Outros óleos vegetais que podem ser epoxidados incluem linhaça, milho, cártamo, semente de melão, semente de algodão, óleo de semente de borracha. Epoxidações de óleos vegetais não comestíveis como canola, mahua, jatropha e karanja também foram relatados (Milchert; Malarczyk; Kłos, 2015). Uma variedade de OVEs e EAGE epoxidados estão comercialmente disponíveis sob vários nomes comerciais, sendo os mais prevalentes o óleo de soja epoxidado (OSE) e o óleo de linhaça epoxidado (OLE) (Moser *et al.*, 2022). O óleo de soja é um dos óleos vegetais mais amplamente epoxidados, com uma produção de mais de 200.000 toneladas métricas por ano (Milchert; Malarczyk; Kłos, 2015). O óleo proveniente de algas também têm sido reconhecido como uma fonte adequada para o desenvolvimento de bioprodutos. Especificamente, as microalgas são conhecidas por conterem quantidades significativas de proteínas, lipídios e carboidratos, que podem ser utilizados como matérias-primas para a produção de materiais poliméricos e resinas compostas (Hidalgo *et al.*, 2020).

Em comparação com o OVE, os EAGE apresentam algumas vantagens. Primeiramente, eles podem ser obtidos a partir de diversas matérias-primas, como diferentes óleos por meio de transesterificação, ou até mesmo a partir de ácidos graxos por esterificação. Isso amplia a disponibilidade de matérias-primas, inclusive permitindo a utilização de diferentes tipos de

óleos, como o óleo de soja usado (OSU). Em segundo lugar, esses ésteres apresentam melhores propriedades de lubrificação, compatibilidade e dispersibilidade em comparação com o OVE, além de proporcionarem maior flexibilidade e maior tempo de envelhecimento quando adicionados a diversos produtos de interesse industrial, como plásticos de policloreto de vinila (PVC) (Wang *et al.*, 2018).

3.4.2 PROCESSOS EMPREGADOS NA OBTENÇÃO DE ÓLEOS E ÉSTERES EPOXIDADOS

Desde a década de 1940, perácidos orgânicos têm sido empregados na epoxidação de óleos vegetais. Sendo assim, métodos de epoxidação que utilizam perácidos pré-formados ou que formam perácido *in situ*, são frequentemente utilizados (Jadhav *et al.*, 2021). O método predominante utilizado para a epoxidação de alcenos é conhecido como reação de Prilezhaev (ou Prileschajew). Nesse processo, perácidos são gerados *in situ* a partir da oxidação de precursores de ácidos carboxílicos, utilizando-se peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de catalisadores ácidos minerais, como ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido nítrico (HNO_3) e ácido clorídrico (HCl) (Moser *et al.*, 2022). A formação dos perácidos ocorre por meio de um equilíbrio, sendo geralmente lenta sem a presença de catálise ácida. Os perácidos mais comumente empregados na epoxidação de Prilezhaev são o ácido perfórmico e o ácido peracético, sendo o ácido perfórmico mais eficiente na epoxidação de óleo de soja. Os perácidos são substancialmente menos ácidos do que os ácidos carboxílicos correspondentes, o que reduz a ocorrência de reações ácido-base secundárias (Miao *et al.*, 2013; Moser *et al.*, 2022). O principal subproduto da epoxidação é o ácido carboxílico correspondente ao perácido utilizado (Ju *et al.*, 2020). A reação ocorre em uma fase oleosa e aquosa, na qual a água, o ácido carboxílico, o H_2O_2 e o catalisador ácido mineral permanecem na fase aquosa, enquanto o ácido graxo e o epóxido são encontrados na fase oleosa. Variáveis como a velocidade de agitação do reator podem influenciar a reação (Gorla *et al.*, 2013; Moser *et al.*, 2022). Além disso, a composição dos ácidos graxos tem um efeito significativo na taxa de epoxidação. A epoxidação de Prilezhaev é tolerante a grupos hidroxila, éster, ceto e éter. Devido à tendência dos epóxidos em reagir em condições ácidas, reações colaterais irreversíveis podem ocorrer na interface entre as fases aquosa e oleosa, onde os epóxidos recém-formados podem encontrar o ácido. Reações secundárias indesejáveis comuns incluem hidrólise, polimerização e acilação (gerando hidroxiésteres) (Moser *et al.*, 2022). O processo de epoxidação é exotérmico e deve ser controlado para evitar aumentos indesejáveis de temperatura (na qual podem diminuir o

rendimento do epóxido desejado), especialmente em grandes escalas industriais, além de representarem riscos a segurança (Miao *et al.*, 2013; Moser *et al.*, 2022).

3.4.3 ÓLEOS VEGETAIS EPOXIDADOS E SEUS DERIVADOS: APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os óleos vegetais epoxidados (OVes) e seus derivados possuem uma ampla gama de aplicações industriais. Eles são utilizados como solventes, lubrificantes, pré-polímeros em revestimentos de superfície, estabilizadores em policloreto de vinila (PVC), plastificantes para plásticos, aditivos em asfaltos, fluidos transformadores, entre outros. Além disso, são empregados na produção de polímeros, como poliuretanos, e na fabricação de nanocompósitos. Esses óleos oferecem vantagens em relação aos produtos petroquímicos, proporcionando propriedades mecânicas, elétricas e térmicas melhoradas (Sharmin *et al.*, 2015). A epoxidação de óleos vegetais, especialmente o óleo de soja, tem sido amplamente explorada, mas a viabilidade da reação depende do teor e do tipo de ácido graxo insaturado presentes nos triglicerídeos dos óleos (Xia *et al.*, 2010).

A epoxidação é um processo eficiente para a modificação de olefinas, fornecendo novos grupos reativos com propriedades vantajosas que podem ser amplamente utilizadas em diversas aplicações. Os epóxidos derivados de olefinas são valiosos como intermediários devido à alta reatividade do anel oxirano, permitindo a conversão em uma ampla variedade de compostos, como álcoois, polímeros, compostos olefinicos, alcanolaminas, compostos carbonílicos e glicóis (Jadhav *et al.*, 2021). Além disso, os ácidos graxos ou ésteres provenientes desses óleos são materiais interessantes para o desenvolvimento de resinas epóxi sustentáveis, sendo os derivados do óleo de tungue e óleo de soja utilizados para tal fim. Diversas pesquisas desenvolveram uma série de resinas epóxi de base biológica fazendo uso de ácidos graxos de óleo de tungue. Esses ácidos graxos foram modificados com grupos epóxi e reticulados na presença de anidridos ou bismaleimidas (Frias *et al.*, 2017).

Devido ao seu baixo custo, biodegradabilidade, renovabilidade e baixa toxicidade, os OVes são considerados substitutos ideais para plastificantes ftalatos não renováveis, como o dioctilftalato (DOF), visto que este e outros ftalatos tem sido proibido em muitos países devido aos seus impactos negativos na saúde humana e no meio ambiente (Moser *et al.*, 2022). Os plastificantes mais renováveis e seguros são provenientes do óleo vegetal epoxidado ou de seus derivados, como os ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE), podendo ser utilizados como bioplastificantes em alimentos e materiais de contato (Wang *et al.*, 2018). O anel epóxido

presente no OVE ou EMAE tem a capacidade de reagir com o cloreto de hidrogênio gerado durante a degradação do PVC, restaurando os átomos de cloro de volta às cadeias poliméricas (Moser *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2018). Além das aplicações como plastificantes, os OVEs também encontram uso direto como diluentes reativos em tintas, modificadores de viscosidade, aditivos lubrificantes e agentes removedores de ácidos, além de atuarem como inibidores de corrosão em plásticos. Esses óleos também podem ser submetidos à polimerização catiônica ou cura por meio de aminas ou anidridos, resultando em resinas termoendurecíveis (Ju *et al.*, 2020; Lu *et al.*, 2010; Moser *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2018).

O EMAE mostra uma propriedade plastificante diferente e única na síntese de resina celulósica e borracha sintética, quando comparado ao OVE (Omonov *et al.*, 2022). Portanto, é de grande relevância estudar os processos de epoxidativos envolvendo ésteres monoalquílicos (EMA), assim como os processos de epoxidação de óleos vegetais, como o óleo de soja usado (OSU), que também pode ser aplicado ao EMA. Através desses processos é possível a obtenção de novos compostos com propriedades melhoradas e que poderão ser aplicadas no desenvolvimento de produtos químicos ecológicos e biodegradáveis (Ju *et al.*, 2020; Musik *et al.*, 2021; Omonov *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2018).

Diante disso, a presente proposta consiste na produção de ésteres epoxidados por um processo de três etapas empregando lipases (livres e imobilizada) e catalisadores homogêneos (ácido fórmico e H_2O_2). Os resultados apresentados evidenciam que o este novo processo pode ser considerado uma abordagem promissora para a obtenção de oleoquímicos de alto valor a partir de matérias-primas renováveis e de baixo custo. Dessa forma, este estudo contribui significativamente para o avanço de metodologias sustentáveis e viáveis sob o ponto de vista econômico, bem como propicia a descoberta de uma nova classe de compostos com versatilidade para diferentes aplicações.

4 ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO “CATALYSTS”

(DOI - <https://doi.org/10.3390/catal13030543>)

4.1 INTRODUÇÃO

Combustíveis fósseis como carvão, gás natural e petróleo têm sido amplamente utilizados como matérias-primas para a síntese de diversos combustíveis e produtos químicos. No entanto, esses materiais não renováveis têm causado uma variedade de efeitos nocivos ao meio ambiente, como o aquecimento global por emissões de gases de efeito estufa, contaminação da terra e poluição do ar/água (JIANG *et al.*, 2022). Nas últimas décadas, materiais renováveis têm ganhado grande atenção mundial como substitutos promissores aos materiais derivados de petróleo devido aos seus benefícios ambientais e sustentabilidade (JIANG *et al.*, 2022; RENEWABLE CHEMICALS, 2022). Na verdade, muitas organizações governamentais e ambientais impuseram regulamentos rigorosos que visam reduzir as emissões de gases de efeito estufa em vários países, substituindo materiais tradicionais à base de petróleo por materiais de base renovável (RENEWABLE CHEMICALS, 2022; BIOMASS EXPLAINED, 2022). Há uma grande variedade de materiais renováveis para produzir biocombustíveis e outros produtos valiosos para as indústrias químicas, como diferentes tipos de culturas agrícolas, madeira, microrganismos, esterco animal, esgoto humano e resíduos agrícolas (BIOMASS EXPLAINED, 2022). Dentre esses diferentes materiais renováveis, os triacilgliceróis (TAG), como óleos vegetais e microbianos, gorduras animais, óleos usados (óleos de fritura, graxas e borra do processo de refino de óleos vegetais) e seus derivados (AGL) têm sido considerados promissores matérias-primas para a produção de produtos industriais (BERENBLYUM *et al.*, 2016; BAENA *et al.*, 2022). Excepcionalmente, a utilização de óleos de fritura, incluindo óleos de cozinha usados, tem sido considerada uma opção ecológica e econômica devido aos seus preços mais baixos do que os óleos vegetais comestíveis e seu uso minimiza problemas ambientais devido à sua direta descarte na natureza (FOO *et al.*, 2021, MANNU *et al.*, 2020).

Em alguns casos, o uso direto de matérias-primas oleaginosas, incluindo óleos usados, não é recomendado devido à presença de átomos reativos de β -hidrogênio na fração glicerol e ligações duplas em ácidos graxos insaturados, resultando em baixa estabilidade térmica e oxidativa (ZAINAL *et al.*, 2018; HOO *et al.*, 2019; BOLINA *et al.*, 2021; MOSER *et al.*, 2022). Nesse contexto, os avanços das tecnologias têm sido extensivamente aplicados em seu processamento, a fim de promover sua utilização em indústrias oleoquímicas, tais como

modificações químicas, visando explorar seus grupos funcionais (MANNU *et al.*, 2020). As principais estratégias de modificação química utilizadas são hidrólise, esterificação, transesterificação, hidrogenação, epoxidação e abertura de anéis reações (BAENA *et al.*, 2022; HO *et al.*, 2019; BOLINA *et al.*, 2021; MOSER *et al.*, 2022; GASHEMLOU *et al.*, 2019; BELOUSOV *et al.*, 2021; MENDES *et al.*, 2022). Curiosamente, essas diferentes estratégias também têm sido comumente combinadas para introduzir grupos funcionais em suas estruturas químicas, visando expandir sua versatilidade e aplicação em indústrias químicas (BAENA *et al.*, 2022; MOSER *et al.*, 2022; BELOUSOV *et al.*, 2021; MENDES *et al.*, 2022). Neste sentido, materiais epoxidados obtidos de diferentes matérias-primas oleaginosas têm sido amplamente utilizados como lubrificantes, plastificantes, sequestrantes ácidos, estabilizantes, reciclados materiais de pavimento asfáltico, revestimentos e inibidores de corrosão (MOSER *et al.*, 2022; BELOUSOV *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2018; THUY & LAN, 2021; BAI *et al.*, 2020; SHI *et al.*, 2022; MADHUSUDHANA *et al.*, 2022). Eles também podem ser transformados em várias matérias-primas químicas de valor agregado para a produção de biopolímeros/bioplásticos, incluindo polióis/poliuretanos, estólideos e surfactantes via reações de abertura de anel epóxi (MOSER *et al.*, 2022; GAGLIERI *et al.*, 2022; GE & DOU, 2022; YANG *et al.*, 2023; ARMANASCO *et al.*, 2022; CHEN *et al.*, 2020; POLACZEK *et al.*, 2022).

Nesse contexto, o objetivo principal do presente estudo foi a produção e caracterização de ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) a partir de OSU e óleo fúsel por um processo de três etapas. A etapa inicial foi a hidrólise completa de OSU para produzir AGL, seguida da esterificação do AGL obtidos com óleo fúsel e epoxidação dos ésteres. Neste estudo, várias preparações de lipase com diferentes especificidades foram usadas para produzir AGL por meio da hidrólise do óleo usado (OSU), tais como lipase de *Candida rugosa* (LCR), uma lipase não específica (DE MARIA *et al.*, 2006); lipase de *Thermomyces lanuginosus* produzido por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* (Eversa® Transform 2.0 – ET2.0 – *sn*-1,3-específica) (MONTEIRO *et al.*, 2021); *Candida* sp. (CALA - *sn*-2-específica) (MONTEIRO *et al.*, 2021) *Rhizopus japonicus* (LRJ – *sn*-1,3- específica) (FREGOLENTE *et al.*, 2009) e *Aspergillus niger* (LAN - *sn*-1,3-específica) (FREGOLENTE *et al.*, 2009). Neste conjunto de experimentos, uma combinação entre uma lipase *sn*-1,3- específica (ET2.0) e uma lipase *sn*-2- específica (CALA) também foi avaliado. Estas reações foram conduzidas em ausência de agentes emulsificantes ou tampão, o que requer uma agitação mecânica vigorosa para preparar interfaces água/óleo estáveis para melhorar o desempenho catalítico das lipases (SABI *et al.*, 2022). A produção de EMA por esterificação enzimática de AGL e óleo fúsel, um

valioso subproduto a partir da produção de bioetanol composto por uma mistura de etanol, propanol, isobutanol e álcool isoamílico (este último seu principal componente) (MENDOZA-PEDROZA *et al.*, 2021; MASSA *et al.*, 2023), foi conduzido em um processo ecologicamente correto e sustentável (sistema isento de solventes) (SOUSA *et al.*, 2021). Uma vez que a esterificação é uma reação reversível (SANDOVAL *et al.*, 2002; SÉVERAC *et al.*, 2011; MARTY *et al.*, 1997; COLOMBIÉ *et al.*, 1998), estratégias de remoção de água foram realizadas em reatores fechados ou abertos na ausência ou presença de peneiras moleculares, visando aumentar a produção de ésteres. Além disso, estudos anteriores também demonstraram que o uso de suportes hidrofóbicos pode prevenir a formação de uma fase aquosa no microambiente dos biocatalisadores que reduz drasticamente seu desempenho catalítico e reuso (URRUTIA *et al.*, 2018; WANCURA *et al.*, 2021). Para isso, ET2.0, uma preparação comercial de lipase de baixo custo com alta atividade catalítica em meios não aquosos (MONTEIRO *et al.*, 2021; WANCURA *et al.*, 2021), foi imobilizada via adsorção física em esferas hidrofóbicas de poli(estireno-divinilbenzeno) (PSty-DVB) e usado como biocatalisador heterogêneo. Este biocatalisador também demonstrou alto desempenho catalítico e estabilidade operacional (reuso) para a produção de diferentes ésteres valiosos usando matérias-primas sintéticas ou naturais (CARVALHO *et al.*, 2021; MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022). O desempenho catalítico deste biocatalisador heterogêneo (lipase imobilizada) foi comparado com sua forma solúvel (lipase solúvel). Testes de reuso do biocatalisador, após oito sucessivas reações de esterificação em batelada na ausência (reator fechado) e presença (reator aberto) da estratégia de remoção de água, também foram conduzidos. A epoxidação do EMA produzido foi realizada via epoxidação de Prilezhaev (ou Epoxidação de Prileschajew) (MOSER *et al.*, 2022). Esta reação prossegue via geração *in situ* de perácidos (ou perácidos) pela reação entre ácidos carboxílicos (comumente ácidos fórmico e acético) e peróxido de hidrogênio em fase aquosa, seguida de difusão de moléculas de perácido para a fase oleosa para reagir com ligações duplas (MOSER *et al.*, 2022; THUY & LAN, 2021; CAI *et al.*, 2022). Neste estudo, o ácido fórmico, um valioso ácido carboxílico de carboidratos derivados da biomassa (VALENTI *et al.*, 2019), foi selecionado como catalisador homogêneo devido à sua maior reatividade em comparação com o ácido acético (WANG *et al.*, 2018; PETROVIC *et al.*, 2002; JADHAV *et al.*, 2021). Os diferentes produtos (ésteres monoalquílicos não e epoxidados, ou seja, EMA e EMAE, respectivamente) foram identificados por análise de ¹H RMN e suas propriedades químicas foram determinadas por métodos padrões. Até o momento, este é o primeiro estudo a investigar

a produção, através de um processo de três etapas, de EMAE a partir de OSU e óleo fúsel, a partir de dois materiais renováveis e de baixo custo comumente encontrados em diversos países.

4.2 MATERIAS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

Lipases comerciais de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *Aspergillus oryzae* (Eversa[®] Transform 2.0), *Candida* sp. (CALA) e *Candida rugosa* (LCR) foram adquiridos da Sigma-Aldrich[®] (St. Louis, MO, EUA). Lipases não comerciais de *Aspergillus niger* (LAN) e *Rhizopus javanicus* (LRJ) foram produzidos por fermentação submersa (CARVALHO *et al.*, 2006). Estas lipases não comerciais foram obtidas via precipitação sequencial com sulfato de amônio, diálise em água e liofilização, e utilizadas como extratos de lipase em pó (FREGOLENTE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2006). As propriedades destas preparações de lipase são resumidos na Tabela 3. PSty-DVB (Diaion[®] HP-20) foram adquiridas da Supelco[®] Analytical Products (Bellefonte, PA, EUA). As propriedades deste suporte foram relatadas em um estudo recente realizado em nosso laboratório (MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022). O óleo de soja usado (OSU) foi coletado após ser usado uma vez no preparo de batatas fritas no restaurante da Universidade Federal de Alfenas (Alfenas, MG, Brasil). A sua composição em ácidos graxos (% m.m⁻¹) foi determinado por cromatografia gasosa do seguinte modo (SANTOS *et al.*, 2013): 10,7% palmítico, 3,0% esteárico, 24,0% oleico, 56,7% linoleico, 5,4% linolênico e 0,1% araquídico, com massa molecular média de AGL de 278,6 g.mol⁻¹. O óleo fúsel foi adquirido de Raízen Tarumã Ltda (Tarumã, SP, Brasil), com a seguinte composição (% m.m⁻¹): água (11,6%), etanol (4,2%), propanol (3,9%), butanol (1,1%), álcool isobutil (11,5%) e álcool isoamílico (67,7%), e massa molecular média de 72,5 g.mol⁻¹. A peneira molecular UOP tipo 3 Å (forma de haste e tamanho de 1/16 pol) foi adquirida da Fluka Analytical (St. Louis, MO, EUA). Solução de peróxido de hidrogênio (50% m.m⁻¹), solução de ácido fórmico (85% v.v⁻¹) e solução de Wijs (cloreto de iodo em ácido acético) foram adquiridas de Synth[®] Ltd. (São Paulo, SP, Brasil). Todos os outros reagentes e solventes orgânicos de grau analítico foram adquiridos da Synth[®] Ltd.

Tabela 3 - Propriedades das lipases microbianas utilizadas neste estudo.

Propriedades	Eversa® Transform 2.0	LCR	CALA	LRJ	LAN
Fonte	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<i>Candida rugosa</i>	<i>Candida sp.</i>	<i>Rhizopus japonicus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Formulação	Líquido	Pó	Líquido	Pó	Pó
Atividade hidrolítica ^a (U.g ⁻¹)	19.856,7	16.156,8	806,4	27.436,5	20.224,9
Proteína ^b (mg.g ⁻¹)	35,8	24,5	16,1	74,9	12,7
Atividade específica ^c (U.mg _{prot} ⁻¹)	554,6	659,5	50,1	366,3	1592,5

^a determinado pela hidrólise da emulsão de azeite como substrato – pH 8,0 e 37°C (ALVES *et al.*, 2017); ^b determinado de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976); ^c relação entre atividade hidrolítica e concentração de proteínas (ALVES *et al.*, 2017).

4.2.2 Desidratação do óleo fúsel

Neste estudo, o óleo fúsel foi primeiramente desidratado usando Na₂SO₄ anidro pré-tratado a 250°C por 4 h em forno de mufla. A suspensão contendo Na₂SO₄ anidro (20% m.v⁻¹) foi adicionada a um frasco de vidro fechado imerso em banho-maria termostático com temperatura controlada sob agitação mecânica contínua (240 rpm) a 25 ± 1°C por 24 h de contato. Este procedimento foi repetido duas vezes antes para ser usado como material de partida na reação de esterificação. A concentração de água foi reduzida de 11,6% m.m⁻¹ para ≤2% m.m⁻¹, quantificada por meio do Titler automático Karl Fischer (Koheler Modelo AKF5000).

4.2.3 Hidrólise enzimática do OSU: Triagem de preparações de lipase

A hidrólise enzimática do OSU em sistema batelada foi conduzida sob condições experimentais fixas propostas em estudo recente (SABI *et al.*, 2022). Os sistemas reacionais

foram preparados misturando-se OSU (20 g) e água destilada (30 g) a uma relação óleo:água em massa de 40% m.m⁻¹ em frascos abertos de polipropileno com capacidade de 350 mL imersos em banho-maria com temperatura controlada a 40 ± 1°C sob agitação mecânica contínua (1500 rpm). Para tanto, cinco lipases com diferentes especificidades foram testadas como biocatalisadores utilizando uma carga de lipase de 50 unidades de atividade hidrolítica por grama de mistura reacional (50 U.g⁻¹) que corresponde a: (i) 3,2 g de pó de LCR por Kg de mistura de reação, (ii) 2,5 mL de Eversa® Transform 2.0 por Kg de mistura de reação, (iii) 62,5 mL de CALA por kg de mistura de reação, (iv) 3.2 g de LAN por Kg de mistura de reação e (v) 1,82 g do LRJ por Kg de mistura de reação. Um sexto ensaio foi realizado utilizando uma combinação de lipases comerciais Eversa® Transform 2.0 (33 U.g⁻¹ que corresponde a 1,7 mL de solução bruta de lipase por Kg de mistura de reação) e CALA (17 U.g⁻¹ que corresponde a 21 mL de solução bruta de lipase por Kg de mistura de reação) nas mesmas condições experimentais. A porcentagem de hidrólise (H) foi calculada de acordo com um estudo anterior (ROONEY *et al.*, 2001) como mostra a Eq. (1). As misturas reacionais (100 mL) obtidas da hidrólise do OSU catalisada por LCR foram transferidas para um funil de separação (500 mL), seguido da adição de 100 mL de água destilada a 60°C para separar as fases aquosa e orgânica de lavagem (ácidos graxos livres – AGL). A fase de fundo (aquosa) foi descartada e a fase AGL foi lavada três vezes. Na sequência, Na₂SO₄ (20% m.v⁻¹) previamente seco em forno mufla a 250°C por 4 h, foi adicionado a essa mistura de AGL e mantido por 15 horas em condições estáticas a 25°C para remover traços de água.

$$H = \left(\frac{V_{NaOH} \times 10^{-3} \times M_{NaOH} \times MM_{AGL}}{m \times f} \right) \times 100 \quad (1)$$

onde: V_{NaOH} é o volume de solução de NaOH necessário durante a titulação (mL), M_{NaOH} é a concentração de NaOH (40 mmol. L⁻¹), MM_{AGL} é a massa molecular média de AGL do OSU (278,6 g.mol⁻¹), m é a massa da amostra (1 g) e f é a fração do OSU no início da reação (f = 0,4).

4.2.4 Imobilização da lipase Eversa® Transform 2.0 via adsorção física em esferas PSty-DVB

Uma quantidade de 10 g de PSty-DVB foram inicialmente embebidos em 50 mL de solução de etanol hidratado (70% m.m.⁻¹) por 8 h em condições estáticas a 25°C, seguido de filtração em funil Büchner sob vácuo e lavagem com 200 mL de água destilada (LAGE *et al.*,

2016). Em seguida, o suporte molhado foi adicionado a 190 mL de uma solução de lipase preparada misturando 12 mL de formulação de lipase líquida (Eversa® Transform 2.0) a 178 mL de 5 mmol. L⁻¹ solução de acetato de sódio pH 5,0 (0,21 mg de proteína por mL de solução que corresponde a uma carga proteica inicial de 40 mg de proteína por g de suporte). Essa suspensão foi então transferida para um frasco de vidro fechado de 250 mL e imersa em banho-maria termostático com temperatura controlada sob agitação contínua (200 rpm) a 25 ± 1°C por 12 h de tempo de contato. Finalmente, o biocatalisador heterogêneo foi recuperado via filtração num funil de Buchner sob vácuo, lavado com excesso de água destilada e armazenado a 4°C durante 24 h num congelador a 4°C antes da utilização. O processo de imobilização foi monitorado pela medida da concentração de proteína residual (BRADFORD, 1976) e atividade hidrolítica (CARVALHO *et al.*, 2021; BOUDRANT *et al.*, 2020) na solução sobrenadante em equilíbrio. O rendimento de imobilização foi calculado como a razão entre as unidades de atividade hidrolítica adsorvidas na superfície de suporte e a atividade inicial (BOUDRANT *et al.*, 2020). A atividade catalítica do biocatalisador heterogêneo foi avaliada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva (LAGE *et al.*, 2016). A concentração máxima de proteína adsorvida de 31 mg g⁻¹ de suporte e o rendimento de imobilização de 80% e atividade hidrolítica de 157,3 ± 12,3 U.g⁻¹ de biocatalisador foram obtidos nessas condições experimentais (MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022). Uma unidade internacional (U) de atividade foi definida como sendo a massa de biocatalisador necessária para liberar 1 μmol de AGL por minuto em pH 8,0 (100 mmol. L⁻¹ tampão fosfato de sódio), 37°C e 200 rpm (LAGE *et al.*, 2016).

4.2.5 Procedimento geral para a esterificação enzimática de AGL e óleo fúsel num sistema isento de solventes

A esterificação direta dos AGL purificados a partir da hidrólise enzimática do OSU e de óleo fúsel desidratado foi conduzida em reatores de vidro fechados ou abertos (capacidade de 100 mL com uma relação altura/diâmetro de 2) na ausência ou presença de peneiras moleculares (5% da massa por massa de mistura reacional - 5% m.m⁻¹) contendo 8 g de matérias-primas compostas por AGL na estequiometria:relação molar óleo fúsel – 1:1 (composto por 1,65 g ou 23 mmol de óleo fúsel + 6,35 g ou 23 mmol de AGL). Os sistemas reacionais foram imersos em um banho-maria termostático com temperatura controlada a 40 ± 1°C sob agitação mecânica contínua a 240 rpm contendo uma concentração fixa de biocatalisador de 5

mg de proteína por grama de mistura de reação (que corresponde a 0,166 g de lipase imobilizada ou 0,14 g de lipase solúvel Eversa® Transform 2.0 por grama de mistura de reação). Amostras das misturas reacionais (50 µL) foram periodicamente retiradas, diluídas em 10 mL de solução de etanol hidratado (92,5% m.m⁻¹) e titulado com uma solução de NaOH (40 mmol. L⁻¹) utilizando fenolftaleína como indicador. A porcentagem de conversão de AGL (Y – %) foi determinada como mostrado na Eq. (2) (SABI *et al.*, 2022; LAGE *et al.*, 2016). A produção de ésteres foi realizada em duplicata e os dados experimentais foram representados como média ± desvio. Neste conjunto de experimentos, ensaios de controle foram conduzidos com esferas de PSty-DVB e nenhum consumo de AGL foi detectado nessas condições experimentais, confirmando que todos os AGL consumidos na reação são convertidos em ésteres monoalquílicos.

$$Y = \left(\frac{AGL - AGL_t}{AGL_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde: AGL₀ e AGL_t são a concentração inicial e residual de AGL após um dado tempo de reação t (mol. L⁻¹), respectivamente.

A Produtividade (µmol.min⁻¹.mg_{prot}⁻¹) foi determinado de acordo com a equação rearranjada proposta por (MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022) – Eq. (3):

$$P = \frac{AGL_0 \times Y}{t_e \times m_{prot.}} \quad (3)$$

onde: AGL₀ é o número inicial de mols de AGL na mistura de reação (23 mmol ou 23.000 µmol), Y é a porcentagem média de conversão de AGL em equilíbrio (%), t_e é o tempo de reação em equilíbrio (min) e m_{prot} é a quantidade de proteína na mistura de reação (mg).

4.2.6 Ensaios de reuso do biocatalisador

Testes de reuso do biocatalisador heterogêneo preparado neste estudo (lipase imobilizada Eversa® Transform 2.0) foram realizados após oito reações consecutivas de esterificação conduzidas em reator aberto ou fechado sob condições experimentais fixas, como descrito acima. Ao final de cada reação, 30 min e 45 min, realizada em reator aberto e fechado,

respectivamente, a lipase imobilizada foi recuperada via filtração em funil de Büchner sob vácuo, lavada em excesso com hexano frio para remover materiais de partida residuais ou produtos retidos em sua superfície e mantida para secar em freezer a 4°C durante a noite. Em seguida, o biocatalisador recuperado foi ressuspenso em uma nova mistura de reação para iniciar novas reações. A porcentagem de conversão ácida foi determinada ao final de cada reação.

4.2.7 Procedimento geral para a epoxidação *in situ* de ésteres monoalquílicos provenientes do OSU e do óleo fúsel

A epoxidação *in situ* do EMA produzido foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Wang *et al.*, 2018. Inicialmente, 20 g dos ésteres foram introduzidos em um reator de polipropileno aberto com capacidade de 350 mL contendo 10,4 g de água destilada e imerso em banho-maria com temperatura controlada a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ sob agitação mecânica contínua (500 rpm). Após 15 min de contato, 4,32 g de solução de ácido fórmico a 85% m.m⁻¹ foram adicionados, seguidos de adição em gotas de 2.5 g de solução de H₂O₂ a 50% m.m⁻¹. Após 4 h de reação, a mistura também foi transferida para um funil de separação (500 mL), seguido da adição de 100 mL de água destilada a 70°C para separar as fases aquosa e orgânica de lavagem (ésteres monoalquílicos epoxidados). A fase de fundo (aquosa) foi descartada e a fase orgânica foi lavada cinco vezes. Por fim, o Na₂SO₄ (20% m.v⁻¹), previamente seco em forno mufla a 250°C por 4 h, foi adicionado aos ésteres epoxidados e mantido durante a noite em condições estáticas a 25°C para remover vestígios de água.

4.2.8 Métodos analíticos

4.2.8.1 Índice de iodo (II)

II, parâmetro que descreve a quantidade de grau de insaturação na estrutura química dos ésteres e definido como a massa de iodo da solução de Wijs consumida por 100 g de amostras, foi determinado de acordo com a metodologia padrão descrita por Sociedade Americana de Ensaio e Materiais – ASTM D5554-95 (determination of the iodine value of fats and oils, 2022) IV foi calculado pela seguinte equação (Eq. (4)):

$$II = \frac{(V_c - V_s) \times 10^{-3} \times C \times MM_{I_2} \times 100}{2 \times m} \quad (4)$$

onde: V_c e V_s são o volume total da solução de tiosulfato de sódio utilizado para titular as amostras inicial (controle) e oxidada (mL), respectivamente; C é a concentração molar da solução de tiosulfato de sódio ($0,1 \text{ mol. L}^{-1}$); MM_{I_2} é a massa moléculada de iodo ($253,8 \text{ mol. L}^{-1}$); e m é a massa da amostra de ensaio ($0,25 \text{ g}$).

4.2.8.2 Porcentagem relativa de conversão das ligações duplas

Porcentagem relativa de conversão de ligações duplas ou grau de insaturação (X) foi determinado de acordo com a Eq. (5) (THUY & LAN, 2021; SUZUKI *et al.*, 2018):

$$X = \left(\frac{II_0 - II_t}{II_0} \right) \times 100 \quad (5)$$

onde: II_0 e II_t são o índice de iodo para amostras iniciais (controle) e oxidadas (gI_2 por 100 g), respectivamente.

4.2.8.3 Índice de acidez (IA)

A IA, definida como a massa de KOH (em mg) necessária para neutralizar 1 g de amostra de óleo, foi determinada por titulação potenciométrica de acordo com o método oficial da AOCS Te 1a-64 (ACID VALUE, 2017) como mostra a Eq. (6):

$$IA = \frac{V \times 10^{-3} \times C \times MM_{KOH}}{m} \quad (6)$$

onde: V é o volume total de solução de hidróxido de sódio utilizado para titular a amostra (ml); C é a concentração molar da solução de hidróxido de sódio ($0,04 \text{ mol. L}^{-1}$); MM_{KOH} é a massa moléculada de hidróxido de potássio ($56,1 \text{ mol. L}^{-1}$); e m é a massa da amostra de ensaio (1 g).

4.2.8.4 Porcentagem teórica máxima de oxigênio ($OOC_{teor.}$)

O $OOC_{teor.}$ foi calculado de acordo com a seguinte equação (Eq. (7)) (WANG *et al.*, 2018; THUY & LAN, 2021):

$$OOC_{teor.} = \left(\frac{\frac{I_0 \times MM_O}{2 \times MM_I}}{100 + \frac{I_0 \times MM_O}{2 \times MM_I}} \right) \times 100 \quad (7)$$

onde: I_0 é índice de iodo inicial da amostra (g_{I_2} por 100 g); MM_O é a massa atômica de oxigênio (16 u); e MM_I é a massa atômica do iodo (126,9 u).

4.2.8.5 Porcentagem experimental máxima de oxigênio ($OOC_{exp.}$)

$OOC_{exp.}$, definida como a massa de oxigênio oxirano introduzida em 100 g de amostra (WANG *et al.*, 2018), foi determinada conforme recomendado pela norma nacional chinesa GB/T 1677–2008 (Eq. (8)):

$$OOC_{exp.} = \frac{\left[V_C - \left(V_S - \frac{V_{VA} \times m}{m_{VA}} \right) \right] \times 10^{-3} \times C \times MM_O \times 100}{m} \quad (8)$$

onde: V_C é o volume de solução de NaOH utilizado para titular a amostra controle (mL); V_S é o volume de solução de NaOH usado para titular ésteres epoxidados (mL); V_{VA} é o volume de solução de NaOH usado para titular a amostra de ésteres epoxidados na determinação do valor ácido (VA) (mL); m é a massa da amostra de ensaio (g); m_{VA} é a massa da amostra de teste utilizada na determinação da VA (g); C é a concentração molar da solução de NaOH; e MM_O é a massa molecular de oxigênio oxirano ($16 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$).

4.2.8.6 Porcentagem relativa de conversão em oxirano (ROC)

Esse parâmetro foi calculado da seguinte forma (Eq. (9)) (THUY & LAN, 2021; SUZUKI *et al.*, 2018):

$$ROC = \left(\frac{OOC_{exp.}}{OOC_{teor.}} \right) \times 100 \quad (9)$$

onde: $OOC_{exp.}$ é a porcentagem experimental máxima de oxigênio e $OOC_{teor.}$ é a porcentagem teórica máxima de oxigênio.

4.2.8.7 Selectividade (S)

A seletividade foi determinada de acordo com a seguinte equação (Eq. (10)) (WANG *et al.*, 2018; THUY & LAN, 2021):

$$S = \left(\frac{ROC}{X} \right) \quad (10)$$

onde: ROC é a porcentagem relativa de conversão para oxirano e X é a porcentagem relativa de conversão de ligações duplas – grau de insaturação (X).

4.2.9 Análise de ¹H RMN

A identificação das estruturas químicas de materiais de partida (OSU) e derivados (AGL, e ésteres monoalquílicos não oxidados ou oxidados – EMA e EMAE, respectivamente) foi determinada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (¹H RMN) usando clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano como padrão interno. A análise por RMN foi realizada em equipamento Bruker AC 300 (Bruker BioSpin, Alemanha).

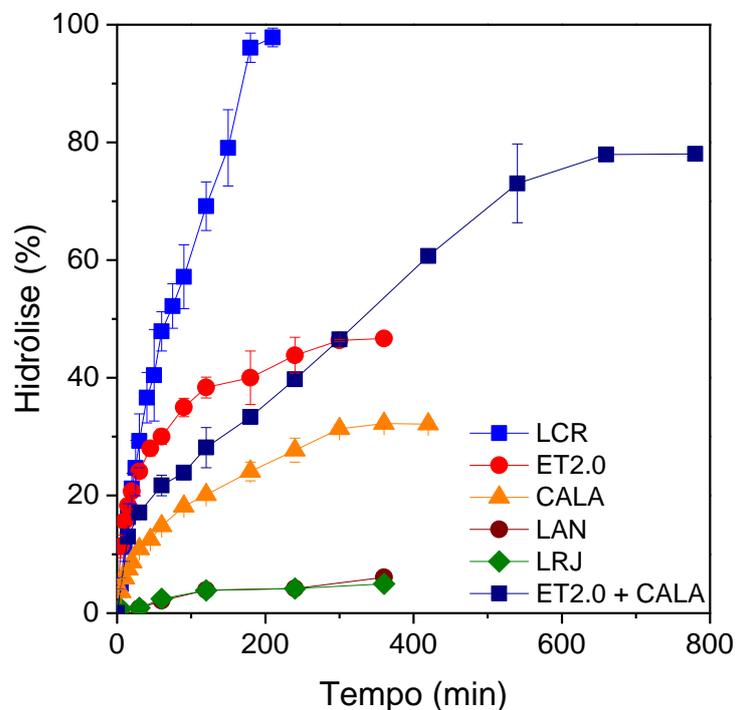
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Produção de AGL por hidrólise enzimática do OSU: Triagem de fontes de lipase

Nesta primeira etapa, a produção de AGL por hidrólise enzimática do OSU utilizando um processo convencional (agitação mecânica e aquecimento por imersão em um banho-maria com temperatura controlada) na ausência de emulsificantes e agentes tampão. De acordo com a Fig. 3, um perfil linear de hidrólise enzimática do OSU catalisado por LCR, uma conhecida lipase não específica, até a conversão quase completa em AGL e glicerol pode ser observado. Como esperado, a reação de hidrólise completa foi alcançada após 180 min de reação. Por outro lado, reações de hidrólise catalisadas por lipases de *Aspergillus niger* (LAN) e *Rhizopus javanius* (LRJ), duas lipases não comerciais *sn*-1,3-específica, deram porcentagem máxima de hidrólise de apenas 8% após 360 min de reação. CALA, uma lipase comercial *sn*-2-específica, exibiu uma hidrólise máxima de 32% após 360 min de reação, indicando uma possível hidrólise quase completa das ligações ésteres na posição média da estrutura do glicerol (posição *sn*-2). Dessa forma, uma mistura de AGL e diacilgliceróis (DAG) poderia ser o principal produto

obtido nesse processo. Uma porcentagem de hidrólise em torno de 45% após 300 min de reação foi obtida usando uma lipase *sn*-1,3-específica de *Thermomyces lanuginosus* (Eversa® Transform 2.0 – ET2.0) como biocatalisador. Neste caso, espera-se um percentual máximo de hidrólise de 66,6%, com formação preferencial de 2-monoacilglicerol (2-MAG) (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 2010). Altas porcentagens de óleo de soja refinado e óleo de cozinha usado catalisadas por uma lipase *sn*-1,3-específica de *Thermomyces lanuginosus* em sua forma imobilizada (Lipozyme TL IM) foram previamente reportados, porém sob complexo aparato experimental (irradiação ultrassônica) e exigência de etapas de extração de AGL utilizando solventes orgânicos (FEITEN *et al.*, 2014; ZENEVICZ *et al.*, 2016). Portanto, um sistema de reação usando uma combinação de uma lipase *sn*-2-específica (CALA) e uma lipase *sn*-1,3-específica (ET2.0) foi realizada nas mesmas condições experimentais com o objetivo de obter uma conversão completa do OSU em AGL usando uma preparação de lipase ativa e estável de baixo custo (ET2.0). Estudos anteriores demonstraram a utilização eficiente da combinação de lipases microbianas (coquetéis enzimáticos) com diferentes especificidades, incluindo a combinação de lipases *sn*-1,3-específicas, como potenciais biocatalisadores para produzir misturas de AGL a partir da hidrólise de diferentes óleos vegetais (RODRIGUES *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2020). No entanto, a porcentagem máxima de hidrólise de 78% após 660 min de reação pode ser observada. O objetivo deste trabalho foi selecionar a preparação de lipase, ou sua combinação, capaz de proporcionar a conversão total do óleo usado em AGL, matéria-prima alvo para a produção de ésteres. Portanto, novos testes foram realizados usando apenas LCR como biocatalisador.

Figura 5 - Influência do tempo de reação na porcentagem de hidrólise de OSU catalisada por lipases microbianas com diferentes especificidades: LCR (*Candida rugosa*), ET2.0 (*Thermomyces lanuginosus*), CALA (*Candida* sp.), LAN (*Aspergillus niger*), LRJ (*Rhizopus javanicus*) e uma mistura ET2.0 + CALA. As reações foram conduzidas na ausência de emulsificantes e agentes tampão, utilizando-se uma relação óleo:água mássica de 40%, agitação mecânica contínua (1500 rpm), 40°C e carregamento inicial de lipase de 50 U por grama de mistura reacional. As unidades de atividade hidrolítica utilizadas para a combinação de lipases específicas foram 17 U de CALA + 33 U de ET2,0 por grama de mistura reacional.



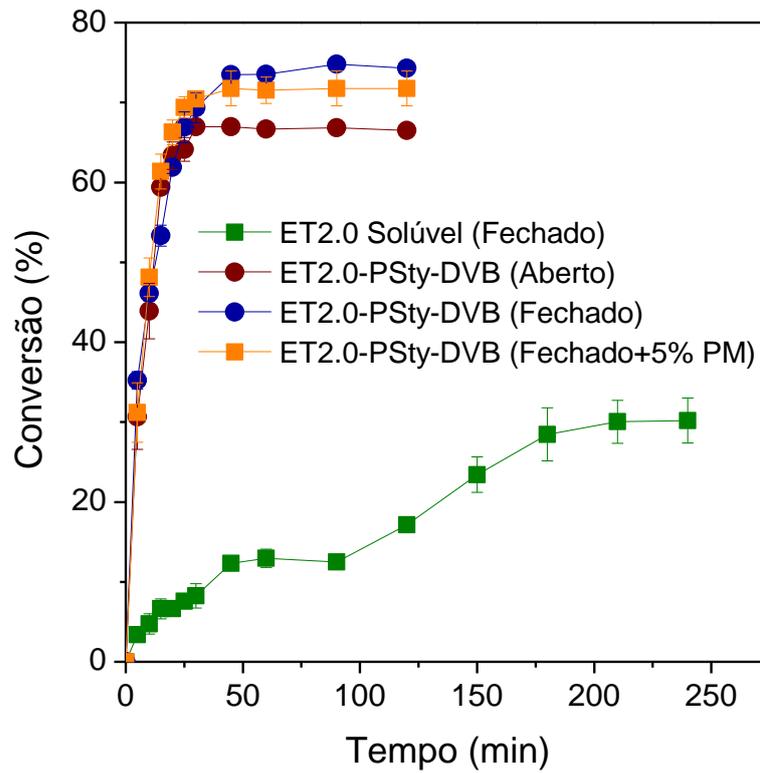
Fonte: Mattos *et al.*, 2023.

4.3.2 Desempenho comparativo da lipase solúvel ou imobilizada ET2.0 na produção de EMA via esterificação em sistemas isentos de solventes orgânicos

O desempenho catalítico da lipase imobilizada ET2.0 na produção de ésteres monoalquílicos (EMA) via esterificação direta de AGL a partir de OSU e óleo fúsel foi investigado e comparado com sua forma solúvel. Neste estudo, a influência de estratégias de remoção de água sobre a reação utilizando peneiras moleculares e/ou reações de esterificação conduzidas em sistemas abertos também foi avaliada e comparada com um sistema reacional realizado na ausência de estratégias de remoção de água (reação de esterificação em reator

fechado na ausência de peneiras moleculares). De acordo com a Fig. 4, a conversão de AGL de apenas 30,2% após 210 min foi obtida usando lipase solúvel como biocatalisador, o que corresponde a uma produtividade de $0,8 \mu\text{mol}_{\text{AGL}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ (Tabela 1). Por outro lado, a lipase imobilizada proporcionou melhor desempenho catalítico na reação, com base na porcentagem de conversão de AGL e nos valores de produtividade. Na verdade, os valores percentuais de conversão de AGL entre $64,3 \pm 2,3\%$ e $73,5 \pm 0,4\%$ foram alcançados após 30-45 min de reação. Neste estudo, a porcentagem máxima de conversão de AGL ($73,5 \pm 0,4\%$) foi alcançada após 45 min de reação conduzida sem qualquer estratégia de remoção de água (esterificação conduzida em reator fechado). Valor percentual de conversão de AGL semelhante ($71,8 \pm 2,2\%$) pode ser observada para o sistema reacional realizado em reator fechado na presença de peneiras moleculares a 5% (m.m⁻¹). Esses sistemas reacionais também apresentaram valores de produtividade semelhantes ($9,3 \pm 0,1 \mu\text{mol}_{\text{AGL}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$), como mostra a Tabela 1. Curiosamente, a reação de esterificação conduzida em uma reação aberta (remoção de água por evaporação simples à pressão atmosférica) exibiu uma porcentagem de conversão de AGL de $64,3 \pm 2,3\%$ após apenas 30 min, o que proporcionou o maior valor de produtividade de consumo de AGL de $12,4 \mu\text{mol}_{\text{AGL}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$ – quase 16 vezes superior ao ET2.0 solúvel (ver Tabela 1). Estes resultados mostram claramente melhor difusão e acesso das moléculas dos materiais de partida aos sítios ativos da enzima adsorvida em sua forma monomérica em conformação aberta dentro dos poros das esferas de PSty-DVB (MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022). Estudos anteriores demonstraram o melhor desempenho catalítico de ET2.0 imobilizado por adsorção física em vários suportes hidrofóbicos, incluindo esferas de PSty-DVB, para catalisar a produção de ésteres industriais via reações de esterificação em modo de batelada (MIGUEL JÚNIOR *et al.*, 2022; CARVALHO *et al.*, 2021; CHOI *et al.*, 2022; FACIN *et al.*, 2021). Além disso, a reação de esterificação conduzida em uma reação aberta sob condições experimentais moderadas (40°C e pressão atmosférica) mostrou ser uma estratégia eficaz para melhorar a produção de ésteres (com base na produtividade do consumo de AGL – ver Tabela 1). Portanto, estudos subsequentes (testes de reuso) foram realizados em reatores fechados e abertos, sem adição de peneiras moleculares.

Figura 6 - Influência do tempo de reação na produção de EMA em sistemas isentos de solventes catalisados por ET2.0 solúvel ou imobilizado em esferas de PSty-DBV utilizando diferentes estratégias de remoção de água. As reações foram a 40°C, 240 rpm, razão estequiométrica AGL:óleo fúsel (1:1) e concentração proteica de 5 mg.g⁻¹ da mistura reacional.



Fonte: Mattos *et al.*, 2023.

Tabela 1 - Estimativa da produtividade para a produção enzimática de ésteres monoalquílicos catalisados por ET2.0 solúvel ou imobilizado em esferas de PSty-DBV utilizando diferentes estratégias de remoção de água.

Sistema de reação	Y ^a (%)	t _e ^b (min.)	P _{AGL} ^c ($\mu\text{mol}_{\text{AGL}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$)
ET2.0d solúvel ^d (Reator fechado)	30,2 ± 2,7	210	0,8
ET2.0-PSty-DVBe ^e (Reator aberto)	64,3 ± 2,3	30	12,4
ET2.0-PSty-DVBe ^e (Reator fechado)	73,5 ± 0,4	45	9,4
ET2.0-PSty-DVBe ^e (Reator fechado + MS ^f -5%)	71,8 ± 2,2	45	9,2

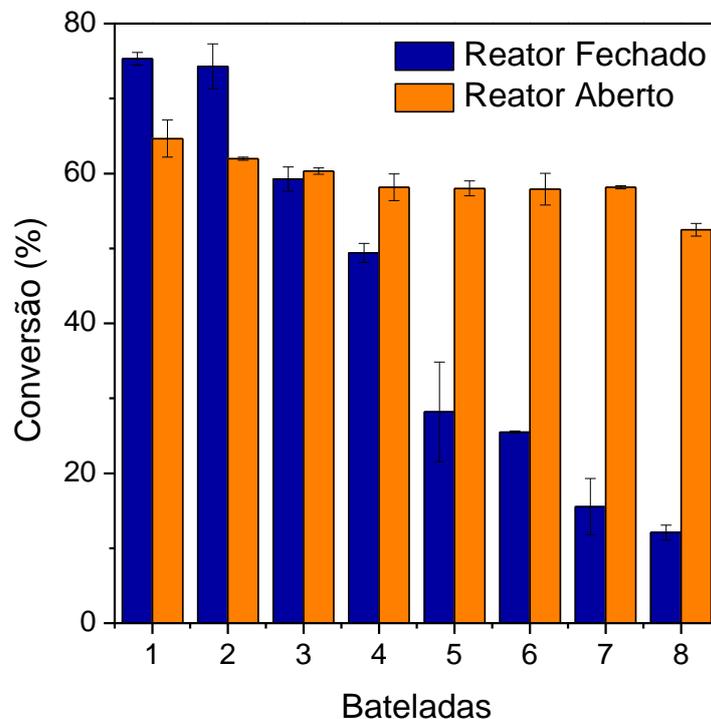
^a porcentagem de conversão de AGL em equilíbrio; ^b tempo de reação em equilíbrio; ^c Produtividade; ^d lipase Eversa[®] Transform 2.0; ^e lipase Eversa[®] Transform 2.0 imobilizada em PSty-DVB; ^f peneiras moleculares a 5% m.m⁻¹.

4.3.3 Estudos de reuso do biocatalisador

Foram realizados testes de reuso da ET2.0 imobilizada após oito reações sucessivas de esterificação em modo batelada, como mostrado na Figura 5. Neste conjunto de experimentos, os tempos de reação foram os necessários para atingir a porcentagem máxima de conversão de AGL em equilíbrio relatada na Tabela 1, ou seja, 30 min e 45 min de reação conduzida em reatores abertos e fechados, respectivamente. De acordo com os resultados, pode-se observar uma diminuição gradual da atividade catalítica da ET2.0 imobilizada após sucessivas reações em batelada conduzidas sem qualquer estratégia de remoção de água (reator fechado na ausência de peneiras moleculares). Na verdade, um percentual de conversão de AGL de apenas 12% (produtividade de $1,5 \mu\text{mol}_{\text{AGL}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$), que corresponde a uma diminuição de 84% de sua atividade original ($73,5 \pm 0,4\%$ na reação do primeiro ciclo), foi alcançada na reação do oitavo ciclo. Estes resultados podem ser explicados por um possível acúmulo de moléculas de água produzidas na superfície do biocatalisador que reduz drasticamente a partição/difusão de materiais de partida hidrofóbicos como AGL e álcool isoamílico do óleo fúsel para os sítios ativos da lipase (PÁEZ *et al.*, 2003; MARTY *et al.*, 1997; SANDOVAL *et al.*, 2002). Por outro lado, reações de esterificação realizadas em reator aberto proporcionaram melhor retenção da

atividade catalítica do biocatalisador heterogêneo após sucessivas reações em batelada. De fato, observa-se uma perda da atividade original do biocatalisador em torno de 18% – de $64,3 \pm 2,3\%$ no primeiro ciclo para $52,5 \pm 0,7\%$ no oitavo ciclo (produtividade de $10,1 \mu\text{mol}_{\text{AGL}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}_{\text{prot}}^{-1}$). Estes resultados confirmam a necessidade de qualquer estratégia de remoção de água (reator aberto) para evitar possível perda do desempenho catalítico da lipase após reações em batelada consecutivas.

Figura 7 - Testes de reuso após sucessivas reações de esterificação de AGL de OSU e óleo fúsel conduzidos em reator fechado e aberto catalisado por ET2.0 imobilizada em esferas PSty-DVB. As reações foram a 40°C , 240 rpm, razão estequiométrica AGL:óleo fúsel (1:1) e concentração proteica de $5 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ da mistura reacional.



Fonte: Mattos *et al.*, 2023.

4.3.4 Epoxidação *in situ* de ésteres monoalquílicos

Neste estudo, o processo de epoxidação *in situ* foi realizado em condições experimentais fixas utilizando ésteres monoalquílicos produzidos via esterificação enzimática em reatores fechados ou abertos. A introdução de oxigênio oxirano em suas estruturas químicas foi determinada de acordo com métodos padronizados e os resultados estão descritos na Tabela 3.

É possível observar um perfil de epoxidação semelhante para ambas as amostras (produção de EMA em reatores abertos ou fechados). O valor índice iodo (II) para o EMA diminuiu de 110 g_{I₂} por 100 g de ésteres a 73 g_{I₂} por 100 g de ésteres, o que corresponde a uma conversão de ligações de insaturação em anéis epóxi (X) em torno de 33%. De acordo com a Fig. 6, a cor das misturas reacionais tornou-se mais escura e alaranjada, confirmando a modificação química dos ésteres produzidos. Essa conversão parcial de ligações duplas em grupos epóxi pode ser devida à presença de AGL não convertidos em sua composição, confirmada pelos valores iniciais de IA entre 5,3 e 5,8 m_{KOH}.g⁻¹, que reduz o processo de epoxidação (THUY & LAN, 2021). Nessas condições, o teor experimental de oxigênio epóxi (OOC_{exp.}) foi de 1,75-1,78%. Esses valores correspondem a apenas 27% do teor teórico de oxigênio epóxi (OOC_{teor.}) – cerca de 6,5%. Estes resultados mostram também que este processo exibiu alta seletividade (acima de 0,8), sugerindo baixa reação de abertura do anel em tais condições, de acordo com relatos anteriores (THUY & LAN, 2021; JADHAV *et al.*, 2021).

Tabela 2 - Propriedades químicas do óleo de soja usado (OSU), ésteres monoalquílicos (EMA) e ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) produzidos.

Propriedades	Unidades	EMA ^a		EMAE ^b	
		Reator aberto	Reator fechado	Reator aberto	Reator fechado
II ^c	g _{I₂} por 100 g	110,2 ± 1,7	109,8 ± 1,1	73,5 ± 0,9	72,6 ± 1,4
X ^d	%	-	-	33,3	33,9
IA ^e	m _{KOH} .g ⁻¹	5,1 ± 0,3	5,8 ± 0,3	7,1 ± 0,4	7,3 ± 0,2
OOC _{teor.} ^f	%	-	-	6,50	6,47
OOC _{exp} ^g	%	-	-	1,75 ± 0,01	1,78 ± 0,03
ROC ^h	%	-	-	26,9	27,5
S ⁱ	Adimensional	-	-	0,81	0,81

^a ésteres monoalquílicos; ^b ésteres monoalquílicos epoxidados; ^c índice de iodo; ^d percentual de conversão relativa;

^e índice de acidez; ^f porcentagem teórica máxima de oxigênio; ^g porcentagem experimental máxima de oxigênio;

^h porcentagem relativa de conversão em oxirano; ⁱ seletividade.

Figura 8 - Fotografia das amostras de óleo de soja usado (OSU ou USCO em inglês), ésteres monoalquílicos (EMA ou MAE em inglês) e ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) para a etapa de esterificação (produção de EMA) realizada em reator aberto (A) e fechado (B).

(A)



(B)



Fonte: Mattos *et al.*, 2023.

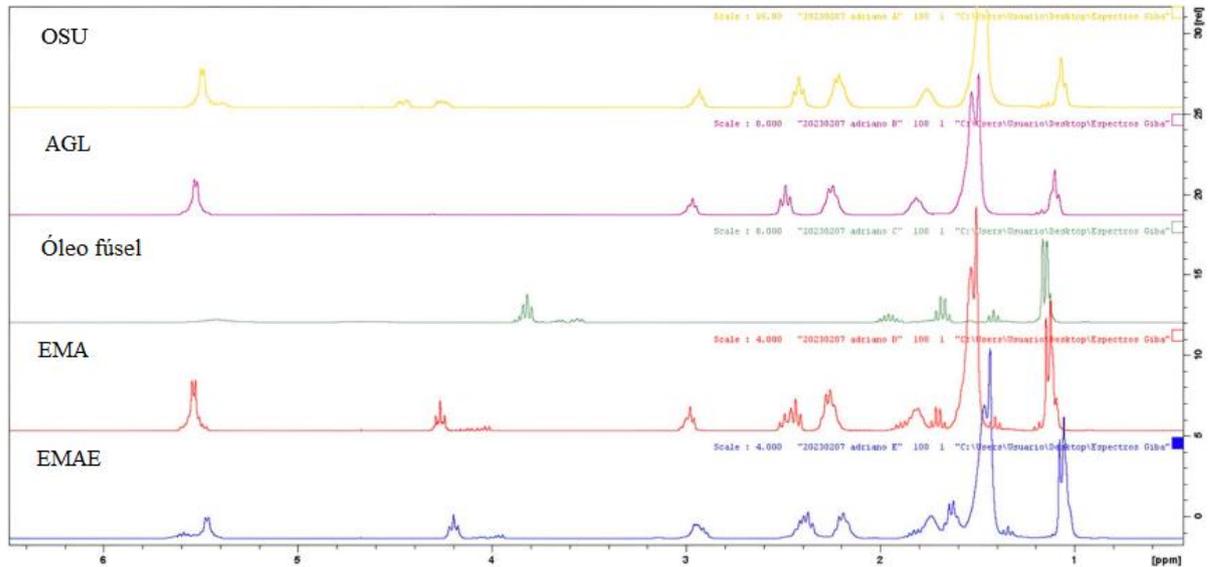
4.3.5 Análise de ^1H RMN

Os espectros de ^1H RMN do óleo fúsel, OSU e seus derivados como AGL, EMA e EMAE são mostrados na Figura 7. Todas as amostras apresentaram um sinal intenso em 1,13–1,17 ppm característico de hidrogênios de grupos metil terminais ($-\text{CH}_3$). Os sinais a 1,49–1,58 ppm de hidrogênios dos grupos metileno alifáticos ($-\text{CH}_2-$) e a 2,06–2,11 ppm para hidrogênios alílicos ($-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$), 2,85–2,95 ppm para hidrogênios bis-alílicos ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) e a 5,24–5,38 ppm de hidrogênios ligados ao carbono sp^2 —olefínico ($-\text{CH}=\text{CH}-$)

de ácidos graxos insaturados são características de OSU e seus derivados (AGL, EMA e EMAE). Os sinais entre 4,10 e 4,40 ppm na estrutura química do OSU referem-se a átomos de hidrogênio da porção glicerol que desapareceram após a etapa de hidrólise (ver espectro AGL). Isso confirma a hidrólise completa do OSU (1ª etapa - ver Figura 3), de acordo com o método titulométrico. Um pico característico de 3,85 ppm no espectro do óleo fúsel refere-se ao hidrogênio metilênico ligado ao grupo hidroxila ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). Observa-se o aparecimento de um sinal intenso entre 4,23 e 4,30 ppm, característico do hidrogênio ligado ao carbono próximo ao grupo éster oxigênio ($-\text{COOCH}_2-$), o que evidencia a produção de ésteres monoalquílicos (EMA) via esterificação enzimática (2ª etapa), conforme mostrado na Figura 4. Após a epoxidação (3ª etapa - produção de EMAE), foi observada uma diminuição na intensidade do sinal característico de hidrogênios olefínicos ($-\text{CH}=\text{CH}-$) em 5,24–5,38 ppm devido à conversão parcial de ligações insaturadas em grupos epóxi. De fato, um ligeiro aumento na intensidade dos sinais sobrepostos em 1,67 ppm (hidrogênio dos grupos metileno adjacentes ao anel epóxi: $-\text{CH}_2-\text{CHOCH}-$) e 2,85–3,25 ppm (átomos de hidrogênio dos grupos epóxi: $-\text{CHOCH}-$) devido à introdução desses grupos epóxi na estrutura química do EMA também pode ser observada. Esses resultados confirmam a formação de ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) por meio de um processo de três etapas.

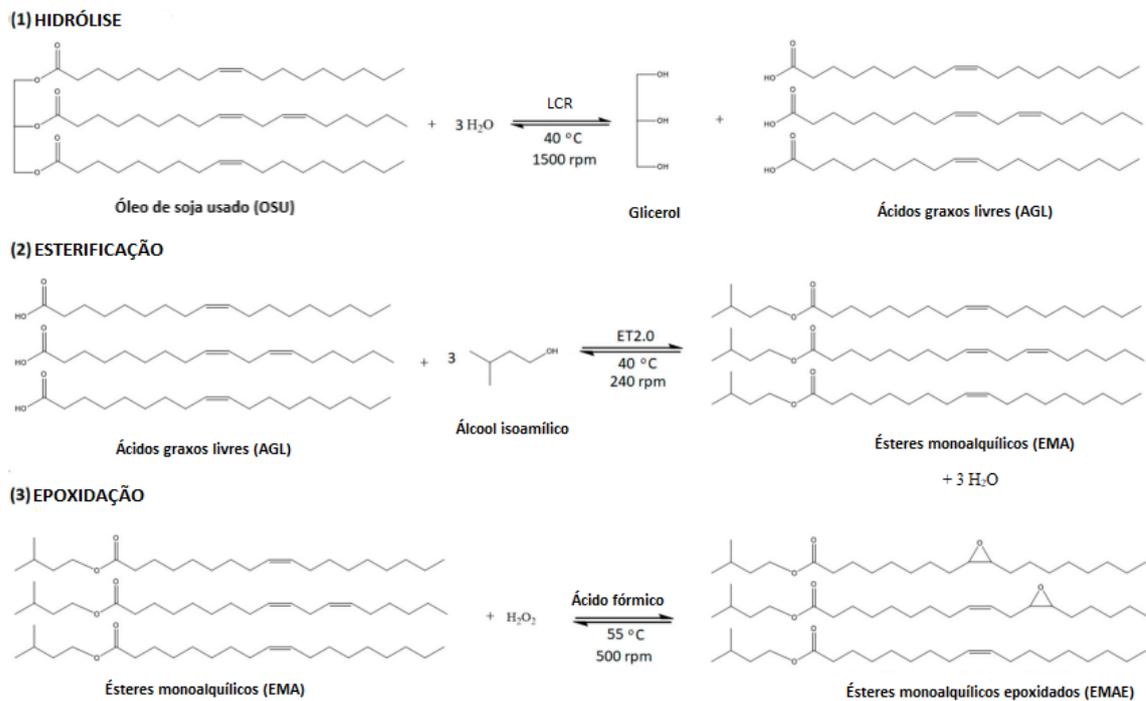
Com base nesses resultados, foi proposto um esquema ilustrativo de produção de EMAE por um processo de três etapas, conforme mostrado na Figura 8. Esse processo consiste em: (i) hidrólise enzimática de OSU, (ii) esterificação enzimática do produto AGL insaturado com álcool isoamílico, principal álcool monoalquil presente na composição do óleo fúsel, e (iii) epoxidação parcial via conversão de ligações insaturadas na estrutura química do EMA produzido em grupos epóxi.

Figura 9 - Espectros de ^1H NMR de óleo fúsel, óleo de soja usado (OSU) e seus derivados – ácidos graxos livres (AGL), ésteres monoalquílicos (EMA) e ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE).



Fonte: Mattos *et al.*, 2023.

Figura 10 - Esquema ilustrativo da produção de ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) a partir de óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel por um processo de três etapas.



Fonte: Mattos *et al.*, 2023.

4.4 CONCLUSÃO

Neste estudo, um processo de três etapas (hidrólise, esterificação e epoxidação) foi proposto para produzir ésteres monoalquílicos epoxidados usando matérias-primas renováveis e de baixo custo, como óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel. De acordo com os resultados, a hidrólise completa do OSU foi alcançada após 3 h de reação conduzida na ausência de emulsificantes e agentes tampão catalisados por uma lipase não específica (LCR). Os AGL produzidos foram utilizados como materiais de partida para a produção de ésteres monoalquílicos via esterificação direta com óleo fúsel realizada em um processo ecologicamente correto (sistema isento de solventes orgânicos). Neste conjunto de experimentos, o desempenho catalítico da lipase solúvel Eversa® Transform 2.0 foi comparado com sua forma imobilizada (adsorção física sobre suporte hidrofóbico – esferas de poli(estireno-divinilbenzeno)). Valores máximos de conversão de AGL e produtividade foram obtidos com lipase imobilizada devido à melhor acessibilidade e partição dos materiais de partida ao microambiente do biocatalisador. Nesta etapa, diferentes estratégias para eliminar moléculas de água geradas durante a reação de esterificação também foram avaliadas. De acordo com os resultados, a porcentagem máxima de conversão de AGL de $73,5 \pm 0,4\%$ foi observada após 45 min de reação realizada em reator fechado. Por outro lado, a reação de esterificação em um reator aberto exibiu uma conversão máxima de AGL de $64,3 \pm 2,3\%$ após apenas 30 min de reação. Testes de reuso mostraram que reações de esterificação conduzidas em reator aberto retiveram cerca de 82% da atividade original do biocatalisador heterogêneo após esterificação em oito bateladas. Estes resultados confirmam a necessidade de uma estratégia simples de eliminação de água via evaporação à pressão atmosférica para evitar a perda da atividade catalítica da lipase imobilizada após sucessivas reações em batelada. A epoxidação *in situ* dos ésteres produzidos usando ácido fórmico como catalisador homogêneo resultou em uma conversão máxima de ligações duplas em grupos epóxi em torno de 33% sob condições experimentais fixas, o que foi confirmado por métodos padrão e análise de RMN. Estes resultados mostram que o processo proposto pode ser uma abordagem promissora para a produção de produtos valiosos (EMA e EMAE) para indústrias oleoquímicas. Além disso, este estudo oferece novas possibilidades para investigar a influência de certos parâmetros no processo de epoxidação *in situ* usando vários catalisadores, incluindo a lipase imobilizada Eversa® Transform 2.0, uma enzima estável e de baixo custo. Estudos adicionais também devem ser realizados utilizando ésteres monoalquílicos não (EMA) e epoxidados (EMAE) como plastificantes potenciais na produção de filmes flexíveis de policloreto de vinila (PVC).

REFERÊNCIAS

- AOCS Te 1a-64—Acid Value (2017) PDF|PDF|Titration|Chemistry. Disponível online em: <https://pt.scribd.com/document/451524050/AOCS-Te-1a-64-Acid-Value-2017-pdf> (acessado em 4 de julho de 2023).
- ARMANASCO, Franco; D'HERS, Sebastián; CHIACCHIARELLI, Leonel Matías. Kinetic and chemorheological modeling of thermosetting polyurethanes obtained from an epoxidized soybean oil polyol crosslinked with glycerin. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 139, n. 47, p. e53194, 2022.
- 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, 2022.
- BAI, Yuchen *et al.* Conversion of fatty acid methyl ester to epoxy plasticizer by auto-catalyzed in situ formation of performic acid: Kinetic modeling and application of the model. **Journal of Cleaner Production**, v. 259, p. 120791, 2020.
- BELOUSOV, Artem S. *et al.* Recent advances in sustainable production and catalytic transformations of fatty acid methyl esters. **Sustainable Energy & Fuels**, v. 5, n. 18, p. 4512-4545, 2021.
- BERENBLYUM, A. S. *et al.* Catalytic methods for the manufacturing of high-production volume chemicals from vegetable oils and fats. **Petroleum Chemistry**, v. 56, p. 663-671, 2016.
- Biomass Explained—U.S. Energy Information Administration (EIA). Disponível online em: <https://www.eia.gov/energyexplained/biomass/> (acessado em 4 de julho de 2023).
- BOLINA, Iara CA; GOMES, Raphael AB; MENDES, Adriano A. Biolubricant production from several oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives. **Bioenergy Research**, p. 1-19, 2021.
- BOUDRANT, Joseph; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Parameters necessary to define an immobilized enzyme preparation. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 66-80, 2020.
- BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.
- CAI, Jinjin *et al.* Novel packed bed reactor designed for Prileschajew epoxidation of fatty acid methyl ester: Intensification of mass/heat transfer. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 176, p. 108960, 2022.

- CARVALHO, Patrícia de O. *et al.* Optimization of enantioselective resolution of racemic ibuprofen by native lipase from *Aspergillus niger*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 33, n. 8, p. 713-718, 2006.
- CARVALHO, Wagner CA *et al.* Eco-friendly production of trimethylolpropane triesters from refined and used soybean cooking oils using an immobilized low-cost lipase (Eversa[®] Transform 2.0) as heterogeneous catalyst. **Biomass and Bioenergy**, v. 155, p. 106302, 2021.
- CERÓN, Annie A. *et al.* Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. **Biomass and Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, 2018.
- CHEN, Yunzhi *et al.* Fatty acid estolides: A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 97, n. 3, p. 231-241, 2020.
- CHOI, Suhyeon *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of 2-ethylhexyl palmitate in a solvent free system using step changes in temperature. **Biochemical Engineering Journal**, v. 177, p. 108261, 2022.
- COLOMBIÉ, Sophie *et al.* Water activity control: A way to improve the efficiency of continuous lipase esterification. **Biotechnology and bioengineering**, v. 60, n. 3, p. 362-368, 1998.
- DE JESÚS MENDOZA-PEDROZA, José *et al.* Recovery of alcohol industry wastes: Revaluation of fusel oil through intensified processes. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 163, p. 108329, 2021.
- DE MARIA, Pablo Dominguez *et al.* Understanding *Candida rugosa* lipases: an overview. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 2, p. 180-196, 2006.
- FACIN, Bruno R. *et al.* Strategies for the immobilization of Eversa[®] Transform 2.0 lipase and application for phospholipid synthesis. **Catalysts**, v. 11, n. 10, p. 1236, 2021.
- FEITEN, Mirian C. *et al.* Batch and fed-batch enzymatic hydrolysis of soybean oil under ultrasound irradiation. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 3, p. 83-85, 2014.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.
- FOO, Wei Han *et al.* The conundrum of waste cooking oil: Transforming hazard into energy. **Journal of hazardous materials**, v. 417, p. 126129, 2021.
- FREGOLENTE, Patricia BL *et al.* Screening of microbial lipases and evaluation of their potential to produce glycerides with high gamma linolenic acid concentration. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, p. 747-756, 2009.

GAGLIERI, Caroline *et al.* Vegetable oils as monomeric and polymeric materials: A graphical review. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 100343, 2022.

GB/T 1677-2008: PDF in English. Disponível online em:
<https://www.chinesestandard.net/PDF.aspx/GBT1677-2008> (acessado em 27 de junho de 2023).

GE, Qiu-yu; DOU, Qiang. “In situ” compatibilization of poly (L-lactic acid)/epoxidized soybean oil bio-blends by reactive additives. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115698, 2022.

GHASEMLOU, Mehran *et al.* Polyurethanes from seed oil-based polyols: A review of synthesis, mechanical and thermal properties. **Industrial Crops and Products**, v. 142, p. 111841, 2019.

GRYGLEWICZ, Stanisław; MUSZYŃSKI, Marcin; NOWICKI, Janusz. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based lubricants. **Industrial crops and products**, v. 45, p. 25-29, 2013.

HO, Calvin K.; MCAULEY, Kimberley B.; PEPPLEY, Brant A. Biolubricants through renewable hydrocarbons: A perspective for new opportunities. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 113, p. 109261, 2019.

JADHAV, Pravin D.; PATWARDHAN, Anand V.; KULKARNI, Ravindra D. Kinetic study of in situ epoxidation of mustard oil. **Molecular Catalysis**, v. 511, p. 111748, 2021.

JIANG, Zhaohua *et al.* Non linear effect of Biomass, fossil fuels and renewable energy usage on the economic Growth: Managing sustainable development through energy sector. **Fuel**, v. 326, p. 124943, 2022.

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

MADHUSUDHANA, Ambale Murthy *et al.* Functionalized graphene oxide dispersed polyvinyl alcohol-epoxidized linseed oil composite: An eco-friendly and promising anticorrosion coating material. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 650, p. 129382, 2022.

MANNU, Alberto *et al.* Available technologies and materials for waste cooking oil recycling. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 366, 2020.

MARTY, Alain; DOSSAT, Valérie; CONDORET, Jean-Stéphane. Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compounds. **Biotechnology and bioengineering**, v. 56, n. 2, p. 232-237, 1997.

MASSA, Thainara B. *et al.* Fusel Oil: Chemical Composition and an Overview of Its Potential Application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 153-166, 2023.

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. 543, 2023.

MENDES, Adriano A.; SOARES, Cleide MF; TARDIOLI, Paulo W. Recent advances and future prospects for biolubricant base stocks production using lipases as environmentally friendly catalysts: A mini-review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 25, 2023.

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, p. 1412, 2022.

MONTEIRO, Rodolpho RC *et al.* Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, v. 362, p. 141-154, 2021.

MONTEIRO, Rodolpho RC *et al.* Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?. **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566-1587, 2021.

MOSER, Bryan R. *et al.* A review of fatty epoxide ring opening reactions: Chemistry, recent advances, and applications. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 99, n. 10, p. 801-842, 2022.

PÁEZ, B. Camacho *et al.* Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 6, p. 845-853, 2003.

PETROVIĆ, Zoran S. *et al.* Epoxidation of soybean oil in toluene with peroxyacetic and peroxyformic acids—kinetics and side reactions. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 104, n. 5, p. 293-299, 2002.

POLACZEK, Krzysztof; KURAŃSKA, Maria; PROCIAK, Aleksander. Open-cell biopolyurethane foams based on bio-polyols from used cooking oil. **Journal of Cleaner Production**, v. 359, p. 132107, 2022.

Renewable Chemicals|Opportunities & Forecast To 2030. Disponível online em: <https://www.psmarketresearch.com/marketanalysis/renewable-chemicals-market#> (acessado em 4 de julho de 2023).

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

ROONEY, D.; WEATHERLEY, L. R. The effect of reaction conditions upon lipase catalysed hydrolysis of high oleate sunflower oil in a stirred liquid-liquid reactor. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 10, p. 947-953, 2001.

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, 2022.

SANDOVAL, G. *et al.* Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: Kinetic and thermodynamic arguments. **Biotechnology and bioengineering**, v. 78, n. 3, p. 313-320, 2002.

SANTOS, Kádima C. *et al.* Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial crops and products**, v. 49, p. 462-470, 2013.

SÉVERAC, Etienne *et al.* Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact. **Enzyme and microbial technology**, v. 48, n. 1, p. 61-70, 2011.

SHI, Ke *et al.* Development of a new rejuvenator for aged SBS modified asphalt binder. **Journal of Cleaner Production**, v. 380, p. 134986, 2022.

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

SOUZA, José ES *et al.* Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-10, 2020.

SUZUKI, Andreia H. *et al.* Sustainable synthesis of epoxidized waste cooking oil and its application as a plasticizer for polyvinyl chloride films. **European Polymer Journal**, v. 99, p. 142-149, 2018.

THUY, Nguyen Thi; LAN, Pham Ngoc. Epoxidation of vietnam rubber seed oil by using peroxophosphatotungstate catalyst complex based on Na₂WO₄/H₃PO₄/H₂O₂ with the presence of phase-transfer catalyst. **Molecular Catalysis**, v. 509, p. 111645, 2021.

URRUTIA, P. *et al.* Immobilization of lipases in hydrophobic chitosan for selective hydrolysis of fish oil: The impact of support functionalization on lipase activity, selectivity and stability. **International journal of biological macromolecules**, v. 108, p. 674-686, 2018.

VALENTINI, Federica *et al.* Formic acid, a biomass-derived source of energy and hydrogen for biomass upgrading. **Energy & Environmental Science**, v. 12, n. 9, p. 2646-2664, 2019.

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

WANG, Junyang; ZHAO, Xuebing; LIU, Dehua. Preparation of epoxidized fatty acid methyl ester with in situ auto-catalyzed generation of performic acid and the influence of impurities on epoxidation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 1881-1891, 2018.

YANG, Jianlei *et al.* Preparation and characterization of bioplastics from silylated cassava starch and epoxidized soybean oils. **Carbohydrate Polymers**, v. 300, p. 120253, 2023.

ZAINAL, N. A. *et al.* A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. **Renewable and sustainable energy reviews**, v. 82, p. 80-102, 2018.

ZENEVICZ, Mara Cristina P. *et al.* Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80,

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos demonstram que o processo desenvolvido em etapas sequenciais para a produção de ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) a partir de óleo de soja usado (OSU) e óleo fúsel apresenta um potencial promissor para a obtenção de oleoquímicos de alto valor. A conversão observada nas três etapas do processo indicaram eficiência e destacaram a viabilidade técnica dessa abordagem. A hidrólise enzimática do OSU para a obtenção de ácidos graxos livres (AGL) foi realizada com sucesso utilizando a lipase não específica de *Candida rugosa* (LCR). Na etapa seguinte, a esterificação dos AGL utilizando a lipase Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0) imobilizada em esferas de poli(estireno-divinilbenzeno), sendo avaliada com diferentes estratégias de remoção de água, resultaram em uma ótima conversão de ésteres monoalquílicos (EMA) ($64,3 \pm 2,3\%$ após 30 minutos de reação em reator aberto e $73,5 \pm 0,4\%$ após 45 minutos de reação em reator fechado). Além disso, o biocatalisador ET 2.0 imobilizado demonstrou uma boa reusabilidade, aproximadamente 82% da atividade original após oito reações sucessivas de esterificação em batelada realizadas em reator aberto. Por fim, os ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) foram obtidos com sucesso, utilizando o processo químico clássico de Prilezhaev com peróxido de hidrogênio e ácido fórmico. Os resultados demonstraram que o processo proposto é capaz de produzir ésteres monoalquílicos epoxidados (EMAE) com uma conversão significativa das ligações insaturadas em grupos epóxi. Essa abordagem oferece vantagens, como a utilização de novas matérias-primas renováveis e de baixo custo (OSU e óleo fúsel), além da aplicação de biocatalisadores imobilizados que apresentam reusabilidade satisfatória. Portanto, esse estudo contribui para o desenvolvimento de métodos sustentáveis e economicamente viáveis para a produção de oleoquímicos de alto valor, além de promover a obtenção de uma nova classe de compostos com potencial para diversas aplicações.

REFERÊNCIAS

- AGUIEIRAS, E. C. G.; SOUZA, S. L.; LANGONE, M. A. P. Estudo do comportamento da lipase comercial Lipozyme RM IM em reações de esterificação para obtenção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 646-650, 2013.
- AL-ZUHAIR, S. *et al.* The effect of fatty acid concentration and water content on the production of biodiesel by lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 30, n. 2, p. 212-217, 2006.
- ASHJARI, M. *et al.* Application of multi-component reaction for covalent immobilization of two lipases on aldehyde-functionalized magnetic nanoparticles; production of biodiesel from waste cooking oil. **Process Biochemistry**, v. 90, p. 156-167, 2020.
- BAENA, A. *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, 2022.
- BAI, Y. *et al.* Conversion of fatty acid methyl ester to epoxy plasticizer by auto-catalyzed in situ formation of performic acid: Kinetic modeling and application of the model. **Journal of Cleaner Production**, v. 259, p. 120791, 2020.
- BEN BACHA, A. *et al.* Biodiesel production by single and mixed immobilized lipases using waste cooking oil. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8736, 2022.
- BERENBLYUM, A. S. *et al.* Catalytic methods for the manufacturing of high-production volume chemicals from vegetable oils and fats. **Petroleum Chemistry**, v. 56, p. 663-671, 2016.
- BINHAYEEDING, N. *et al.* Improvement of biodiesel production using waste cooking oil and applying single and mixed immobilised lipases on polyhydroxyalkanoate. **Renewable Energy**, v. 162, p. 1819-1827, 2020.
- CAI, J. *et al.* Novel packed bed reactor designed for Prileschajew epoxidation of fatty acid methyl ester: Intensification of mass/heat transfer. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 176, p. 108960, 2022.
- DA SILVA, A. P. T. *et al.* Enzymatic catalysis: An environmentally friendly method to enhance the transesterification of microalgal oil with fusel oil for production of fatty acid esters with potential application as biolubricants. **Fuel**, v. 273, p. 117786, 2020.
- DE JESÚS MENDOZA-PEDROZA, J. *et al.* Recovery of alcohol industry wastes: Revaluation of fusel oil through intensified processes. **Chemical Engineering and Processing-Process Intensification**, v. 163, p. 108329, 2021.
- DIAS, A. L. B. *et al.* Fusel oil: Water adsorption and enzymatic synthesis of acetate esters in supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 142, p. 22-31, 2018.

- FERREIRA, M. M. *et al.* Optimization of free fatty acid production by enzymatic hydrolysis of vegetable oils using a non-commercial lipase from *Geotrichum candidum*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 42, p. 1647-1659, 2019.
- FRIAS, C. F. *et al.* Preparation of fully biobased epoxy resins from soybean oil based amine hardeners. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 434-444, 2017.
- GE, Q.; DOU, Q. "In situ" compatibilization of poly (L-lactic acid)/epoxidized soybean oil bio-blends by reactive additives. **Industrial Crops and Products**, v. 188, p. 115698, 2022.
- GORLA, G. *et al.* Preparation and properties of lubricant base stocks from epoxidized karanja oil and its alkyl esters. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 52, n. 47, p. 16598-16605, 2013.
- HIDALGO, P. *et al.* Epoxidation of fatty acid methyl esters derived from algae biomass to develop sustainable bio-based epoxy resins. **Polymers**, v. 12, n. 10, p. 2313, 2020.
- HOSSEINZADEH-BANDBAFHA, H. *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, 2022.
- JADHAV, P. D.; PATWARDHAN, A. V.; KULKARNI, R. D. Kinetic study of in situ epoxidation of mustard oil. **Molecular Catalysis**, v. 511, p. 111748, 2021.
- JIANG, Z. *et al.* Non linear effect of Biomass, fossil fuels and renewable energy usage on the economic Growth: Managing sustainable development through energy sector. **Fuel**, v. 326, p. 124943, 2022.
- JU, Y. *et al.* Preparation of epoxidized fatty acid ethyl ester from tung oil as a bio-lubricant base-stock. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, p. 4145-4155, 2020.
- GUEDES JÚNIOR, J. G. *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, 2022.
- KATSIMPOURAS, C.; STEPHANOPOULOS, G. Enzymes in biotechnology: Critical platform technologies for bioprocess development. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 69, p. 91-102, 2021.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J. *et al.* Producing Natural Flavours from Isoamyl Alcohol and Fusel Oil by Using Immobilised *Rhizopus oryzae* Lipase. **Catalysts**, v. 12, n. 6, p. 639, 2022.
- LU, H. *et al.* Enzymatic epoxidation of soybean oil methyl esters in the presence of free fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 10, p. 1101-1105, 2010.
- MAGHRABY, Y. R. *et al.* Enzyme immobilization technologies and industrial applications. **ACS Omega**, v. 8, n. 6, p. 5184-5196, 2023.

- MANNU, A. *et al.* Available technologies and materials for waste cooking oil recycling. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 366, 2020.
- MASSA, T. B. *et al.* Fusel Oil: Chemical Composition and an Overview of Its Potential Application. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 34, p. 153-166, 2023.
- MIAO, S. *et al.* Synthesis of bio-based polyurethanes from epoxidized soybean oil and isopropanolamine. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 127, n. 3, p. 1929-1936, 2013.
- MILCHERT, E.; MALARCZYK, K.; KŁOS, M. Technological aspects of chemoenzymatic epoxidation of fatty acids, fatty acid esters and vegetable oils: a review. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 21481-21493, 2015.
- MOKHTAR, N. F. *et al.* The immobilization of lipases on porous support by adsorption and hydrophobic interaction method. **Catalysts**, v. 10, n. 7, p. 744, 2020.
- MOSER, B. R. *et al.* A review of fatty epoxide ring opening reactions: Chemistry, recent advances, and applications. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 99, n. 10, p. 801-842, 2022.
- MUSIK, M. *et al.* Effective epoxidation of fatty acid methyl esters with hydrogen peroxide by the catalytic system H3PW12O40/quaternary phosphonium salts. **Catalysts**, v. 11, n. 9, p. 1058, 2021.
- OMONOV, T. S.; PATEL, V. R.; CURTIS, J. M. Biobased Thermosets from Epoxidized Linseed Oil and Its Methyl Esters. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 4, n. 9, p. 6531-6542, 2022.
- PARANDI, E. *et al.* Biodiesel production from waste cooking oil using a novel biocatalyst of lipase enzyme immobilized magnetic nanocomposite. **Fuel**, v. 313, p. 123057, 2022.
- PARANDI, E. *et al.* Lipase enzyme immobilized over magnetic titanium graphene oxide as catalyst for biodiesel synthesis from waste cooking oil. **Biomass and Bioenergy**, v. 173, p. 106794, 2023.
- RODRIGUES, R. C. *et al.* Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, v. 37, p. 746–770, Sept. 2019.
- SALIHU, A.; ALAM, M. Z.; ALAM, M. Z. Production and applications of microbial lipases: a review. **Scientific Research and Essays**, v. 7, n. 30, p. 2667-2677, 2012.
- SAURABH, T. *et al.* Epoxidation of vegetable oils: a review. **Int. J. Adv. Eng. Technol**, v. 2, n. 4, p. 491-501, 2011.
- SHARMIN, E. *et al.* Recent advances in vegetable oils based environment friendly coatings: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 215-229, 2015.

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

SOUZA, J. E. S. *et al.* Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, p. 1-10, 2020.

SOUZA, M. S. *et al.* Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 154, p. 74-88, 2009.

SUN, J. *et al.* Lipase-catalysed ester synthesis in solvent-free oil system: is it esterification or transesterification?. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2828-2832, 2013.

SUZUKI, A. H. *et al.* Sustainable synthesis of epoxidized waste cooking oil and its application as a plasticizer for polyvinyl chloride films. **European Polymer Journal**, v. 99, p. 142-149, 2018.

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

WANG, J.; ZHAO, X.; LIU, D. Preparation of epoxidized fatty acid methyl ester with in situ auto-catalyzed generation of performic acid and the influence of impurities on epoxidation. **Waste and Biomass Valorization**, v. 9, p. 1881-1891, 2018.

WANG, M. *et al.* Biodiesel with low temperature properties: Enzymatic synthesis of fusel alcohol fatty acid ester in a solvent free system. **Renewable energy**, v. 83, p. 1020-1025, 2015.

XIA, Y; LAROCK, R. C. Vegetable oil-based polymeric materials: synthesis, properties, and applications. **Green Chemistry**, v. 12, n. 11, p. 1893-1909, 2010.

YANG, H.; ZHANG, W. Surfactant imprinting hyperactivated immobilized lipase as efficient biocatalyst for biodiesel production from waste cooking oil. **Catalysts**, v. 9, n. 11, p. 914, 2019.

ZENEVICZ, M. C. P. *et al.* Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 235-241, 2016.

ZHANG, T. *et al.* An Efficient Strategy for the Production of Epoxidized Oils: Natural Deep Eutectic Solvent-Based Enzymatic Epoxidation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 96, n. 6, p. 671-679, 2019.

ZHANG, X. *et al.* Chemo-enzymatic epoxidation of *Sapindus mukurossi* fatty acids catalyzed with *Candida* sp. 99–125 lipase in a solvent-free system. **Industrial Crops and Products**, v. 98, p. 10-18, 2017.