

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

CAIO AUGUSTO PRUDENTE DE SOUZA

Síntese de éster emoliente catalisada por lipase imobilizada em suporte híbrido
conduzida em diferentes configurações de biorreatores

Lorena
2020

CAIO AUGUSTO PRUDENTE DE SOUZA

Síntese de éster emoliente catalisada por lipase imobilizada em suporte híbrido conduzida em diferentes configurações de biorreatores

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo como requisito para obtenção do Título de Engenheiro Ambiental.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Larissa de Freitas

Lorena
2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTA TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Prudente de Souza, Caio Augusto
SÍNTESE DE ÉSTER EMOLIENTE CATALISADA POR LIPASE
IMOBILIZADA EM SUPORTE HÍBRIDO CONDUZIDA EM
DIFERENTES CONFIGURAÇÕES DE BIORREADORES / Caio
Augusto Prudente de Souza; orientadora Larissa de
Freitas. - Lorena, 2020.
81 p.

Monografia apresentada como requisito parcial
para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia
Ambiental - Escola de Engenharia de Lorena da
Universidade de São Paulo. 2020

1. Biorreator. 2. Miristato de isopropila. 3.
Lipase imobilizada. 4. Copolímero magnetizado. I.
Título. II. de Freitas, Larissa, orient.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por todos os dias de trabalho e pela “força”, especialmente em momentos difíceis e nas horas de decisão.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Larissa Freitas, pela oportunidade concedida para a realização deste trabalho. Ao Mateus por todo ensinamento e ajuda para a realização dessa monografia.

A Prof^a. Dr^a. Heizir Ferreira de Castro por ter nos dado a oportunidade de realizar as análises do presente trabalho no laboratório de Biocatálise da Universidade de São Paulo.

Aos amigos do meu grupo de Iniciação Científica: Leticia Santana e Ana Cardoso, pelo companheirismo durante a realização do trabalho e pela colaboração nos momentos difíceis.

Aos colegas do laboratório de Biocatálise: Heitor, Ana Karine, Renata e Daniela, pelo auxílio durante a realização dos experimentos e por todo o suporte necessário para a execução deste trabalho.

Aos meus amigos, pelo apoio: Jaqueline, Carolina, Felipe, Julia, Helena e Victor.

À minha família: Maura, José, Cassiano, Marcelo, Adriana, Daniele, Paulo, Valentinna e AnaLu, por todo amor e incentivo.

E por fim, a todos que de forma direta ou indireta envolveram-se e contribuíram com a minha vida acadêmica, o meu muito obrigado!

RESUMO

SOUZA, C. A. P. **Síntese de éster emoliente catalisada por lipase imobilizada em suporte híbrido conduzida em diferentes configurações de biorreatores.** 2020. 81p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Com a globalização e a busca pela sustentabilidade, o emprego da tecnologia limpa junto à processos mais produtivos vem sendo cada vez mais exigidos. Dessa forma a indústria de cosmético, que está em crescimento constante e expressivo, tenta cada vez mais buscar alternativas que substituam as rotas químicas. Dentre os compostos utilizados na indústria da beleza, podemos destacar os ésteres emolientes, muito empregado nas formulações de *skincare*, que tem por características serem atóxicos e biodegradáveis, sendo responsáveis por manter a maciez, plasticidade, hidratação e restauração da oleosidade da pele. Nesse contexto, o presente trabalho teve como objetivo determinar as melhores condições para a síntese enzimática do miristato de isopropila conduzida em diferentes configurações de biorreatores e modos de operação. Para isso, inicialmente foram testadas 3 fontes de lipases: *Candida rugosa*, *Penicillium camemberti* e *Candida antarctica* imobilizadas em poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M). O biocatalisar obtido pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M apresentou os melhores resultados, demonstrando atividade sintética de 1815,67 U g⁻¹ e obtendo rendimentos superiores à 85% em processo descontínuo (frascos agitados). Assim, este biocatalisador foi selecionado para mediar a catálise do miristato de isopropila em diferentes sistemas experimentais. Primeiramente foi avaliada a orientação do fluxo de alimentação em um biorreator de leito fixo (ascendente e descendente), constatando-se que o fluxo descendente favoreceu a síntese. Também foram avaliados diferentes tempos espaciais, observando-se que tempos mais elevados resultavam em baixas produtividades em éster. Com o intuito de elevar o rendimento da reação, foi empregado um sistema experimental constituído por 2 biorreatores de leito fixo e uma coluna extratora de água em série, verificando-se uma maior estabilidade operacional do sistema, apresentando rendimentos na faixa de 90%, concentração em éster de 250 g L⁻¹ e produtividade de 25 g L⁻¹ h⁻¹. Por fim, testou-se o desempenho da síntese em um biorreator de tanque agitado, constatando-se conversão próxima à 100% em apenas 5 horas de reação, mantendo produtividades elevadas (~ 40 g L⁻¹ h⁻¹). O miristato de isopropila foi caracterizado em relação à algumas propriedades importantes para aplicação em cosméticos, apresentando viscosidade de 4,91 mPas e densidade de 0,83 g/cm³, valores estes, similares ao éster disponível comercialmente.

Palavras-chave: Biorreator, Miristato de isopropila, Lipase imobilizada, copolímero magnetizado

ABSTRACT

SOUZA, C. A. P. **Synthesis of emollient ester catalyzed by lipase immobilized on hybrid support conducted in different configurations of bioreactors.** 2020. 81p. Research Project (Graduation in Environmental Engineering) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Nowadays, with globalization and the importance of sustainability, the use of clean technologies and more productive processes has been increasingly required. Thus, the cosmetic industry, that is constantly and expressively growing, increasingly invest and search for alternatives to replace chemical routes. Among the compounds used in the beauty industry, the emollient esters is one that stands out, widely used in skin care formulations, since it has non-toxic and biodegradable characteristics, helping to maintain a soft, plastic and hydrated skin, besides promoting the restoration of skin oiliness. In this context, this study aimed to determine the best conditions for the enzymatic analysis of isopropyl conducted in different configurations of bioreactors and operation modes. For this, three lipases sources were tested: *Candida rugosa*, *Penicillium camemberti* and *Candida antarctica* immobilized in magnetized poly (styrene-co-divinylbenzene) (STY-DVB-M). The biocatalytic test performed by the *Candida antarctica* lipase immobilized on the STY-DVB-M showed best results, demonstrating synthetic activity of 1815.67 U g⁻¹ and more than 85% yield in the selected process (agitated flasks). That is why this biocatalyst was selected to mediate isopropyl catalysis in different experimental systems. First, the feed flow orientation in a fixed bed bioreactor (ascending and descending) was evaluated, verifying that the descending flow favored the synthesis. Different reaction times have been also tested, what showed that higher times results in less ester production. Chasing a better reaction yield, an experimental system was used, being made up of 2 fixed bed bioreactors and a in series water extraction column, with a greater system operational stability, the results was near of 90% yield, 250 g L⁻¹ of ester concentration and 25 g L⁻¹ h⁻¹ of productivity. Finally, the synthesis reaction was tested using a stirred bioreactor tank, what resulted in a conversion close to 100% in just 5 hours of reaction, maintaining high productivity (~ 40 g L⁻¹ h⁻¹). Isopropyl myristate was tested for some important characteristics for application in cosmetics, showing a viscosity of 4.91 mPas and 0.83 g/cm³ of density, this values is similars to commercially available ester

Keywords: Bioreactor, Isopropyl myristate, immobilized lipase, magnetized copolymer

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura tridimensional da lipase de <i>Candida antarctica</i>	18
Figura 2 - Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas.	18
Figura 3 - Conformação do lid da lipase de <i>Candida antarctica</i> (a) "tampa" aberta (b) "tampa" fechada.	19
Figura 4 - Principais métodos de imobilização de lipases	21
Figura 5 - Esquema representativo da formação do Poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de estireno e divinilbenzeno.	24
Figura 6 - Evolução da indústria de cosméticos no Brasil.	25
Figura 7 - Empresas atuantes no mercado de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos no Brasil.	26
Figura 8 - Esquema representativo da formação do miristato de isopropila a partir da esterificação do ácido mirístico e álcool isopropílico.	27
Figura 9 - Modelo de reatores para aplicações com enzima imobilizadas	29
Figura 10 - Esquema de um biorreator de leito fixo com uma coluna: a) Reservatório de substrato; b) Bomba peristáltica; c) Coluna empacotada.	30
Figura 11 – Esquema do biorreator de leito fixo para a síntese do miristato de isopropila: 1 – Banho termostatizado; 2 – Agitador magnético; 3 – Reservatório de substrato; 4 – Condensador; 5 – Bomba peristáltica; 6 – Coluna de vidro.	39
Figura 12 - Aparato experimental para biorreator de leito fixo de duplo estágio com coluna extratora de umidade. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 – Bomba peristáltica; 3 – Primeiro estágio de coluna de vidro; 4 – Banho termostatizado; 5 – Coluna extratora de água; 6 – Segundo estágio de coluna de vidro; 7 – Reservatório de produto.	40
Figura 13 - Esquema do biorreator de tanque agitado para a síntese do miristato de isopropila: 1 – Agitador mecânico; 2 – Camisa de aquecimento; 3 – Impelidor tipo turbina de pá fina aberta; 4 – Biorreator.....	41
Figura 14 - Aparato experimental para purificação do miristato de isopropila	43
Figura 15 - Cromatograma obtido para quantificação do miristato de isopropila.....	45
Figura 16 - Perfil dos rendimentos teóricos obtidos para os ensaios realizados a partir da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em STY-DVB-M.	48

Figura 17 - Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do miristato de isopropila.....	48
Figura 18 - Superfície de resposta obtida pela análise estatística empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.....	50
Figura 19 - Confirmação do modelo estatístico obtido a partir da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em STY-DVB-M.....	50
Figura 20 - Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando lipase G imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do miristato de isopropila.....	52
Figura 21 - Superfície de resposta obtida pela análise estatística empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.....	53
Figura 22 - Confirmação do modelo estatístico obtido a partir da lipase de <i>Penicillium camemberti</i> imobilizada em STY-DVB-M.....	54
Figura 23 - Rendimentos obtidos para a síntese do miristato de isopropila empregando diferentes concentrações de lipase G imobilizada em suporte STY-DVB-M.....	55
Figura 24 - Perfil dos rendimentos teóricos obtidos para os ensaios realizados a partir da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M.....	56
Figura 25 - Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando lipase <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do miristato de isopropila.....	57
Figura 26 - Superfície de resposta obtida pela análise estatística empregando a lipase Cal B imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.....	58
Figura 27 - Confirmação do modelo estatístico obtido a partir da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M.....	59
Figura 28 - Perfil dos rendimentos obtidos na síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50°C em shaker, empregando 10% (m/v) de biocatalisador em meio isento de solvente.....	60
Figura 29 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M, empregando fluxo de alimentação	

ascendente e descendente: a) Rendimento b) Concentração em éster e c) Produtividade.63

Figura 30 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M, alimentação descendente e vazão de 0,01 mL/min: a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.66

Figura 31 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M,, alimentação descendente e vazão de 0,025 mL/min. a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.67

Figura 32 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M, alimentação descendente e vazão de 0,04 mL/min em duplo estágio, empregando coluna extratora de água: a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.70

Figura 33 - Montagem do aparato experimental para biorreatores de batelada com agitação mecânica para síntese do miristato de isopropila da reação de 1:5 Ácido:Álcool.....71

Figura 34 - Resultados obtidos para a síntese do miristato de isopropila em biorreator de tanque agitado catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M: a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimento para avaliar o desempenho da lipase de <i>Candida rugosa</i> e de <i>Penicullium camemberti</i> imobilizadas em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.....	37
Tabela 2 - Matriz experimental realizada para avaliar o desempenho da lipase de <i>Candida rugosa</i> e de <i>Penicullium camemberti</i> imobilizadas em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.	37
Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimento para avaliar o desempenho da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.	38
Tabela 4 - Matriz experimental realizada para avaliar o desempenho da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.	38
Tabela 5 - Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do miristato de isopropila	44
Tabela 6 - Atividade de esterificação dos biocatalisadores obtidos pela imobilização das lipases imobilizadas em STY-DVB-M.	46
Tabela 7 – Rendimentos obtidos nos ensaios pela lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila em 9 horas de reação.	47
Tabela 8 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando LCR imobilizada em suporte STY-DVB-M.....	49
Tabela 9 – Rendimentos obtidos nos ensaios pela lipase de <i>Penicullium camemberti</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila em 9 horas de reação.	51
Tabela 10 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando lipase G imobilizada em suporte STY-DVB-M.	53
Tabela 11 - Rendimentos experimentais obtidos nos ensaios pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila em 9 horas de reação.	56
Tabela 12 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando <i>Candida antarctica</i> imobilizada em suporte STY-DVB-M....	58

Tabela 13 - Resultados obtidos para a síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50°C em shaker, empregando 10% (m/v) de biocatalisador em meio isento de solvente.....	61
Tabela 14 - Perfil das reações de esterificação	62
Tabela 15 - Resultados obtidos para a síntese contínua do miristato de isopropila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50 °C em biorreator de leito fixo, alimentação descendente e vazão de 0,01 mL/min.	64
Tabela 16 - Resultados obtidos para a síntese contínua do miristato de isopropila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50 °C em biorreator de leito fixo, alimentação descendente e vazão de 0,025 mL/min.	65
Tabela 17 - Resultados obtidos para a síntese contínua do miristato de isopropila catalisada pela lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50 °C em biorreator de leito fixo, alimentação descendente e vazão de 0,04 mL/min em duplo estágio, empregando coluna extratora de água.	69
Tabela 18 - Resultados obtidos para a síntese do miristato de isopropila conduzida em reator de tanque agitado.	72
Tabela 19 - Parâmetros do miristato de isopropila obtido pela catálise da lipase de <i>Candida antarctica</i> imobilizada em STY-DVB-M.	74

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Áreas de atuação da lipase de <i>Candida antarctica</i>	20
Quadro 2 - Classificação dos materiais utilizados para a imobilização de enzimas. 23	
Quadro 3 - Utilização do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases.....	24

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivo geral	16
2.2 Objetivos específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 Biotecnologia	17
3.2 Enzima	17
3.3 Lipase	19
3.4 Métodos de imobilização de enzimas	20
3.5 Suporte de imobilização de enzima	22
3.5.1 Poli(estireno-co-divinilbenzeno)	23
3.5.2 Polímero híbrido magnético	25
3.6 Indústria de cosméticos	25
3.7 Miristato de Isopropila	27
3.8 Biorreatores	27
3.8.1 Biorreator de Leito fixo	29
3.8.2 Biorreator de tanque agitado	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Materias	32
4.1.1 Síntese do copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado	32
4.1.2 Síntese e modificação da magnetita	32
4.1.3 Imobilização das enzimas	32
4.1.4 Quantificação da atividade sintética (esterificação) e atividade hidrolítica	32
4.1.5 Síntese dos padrões cromatográficos do miristato de isopropila	33
4.2 Métodos	33
4.2.1 Síntese do suporte	33
4.2.2 Síntese da Magnetita	33
4.2.3 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico	34
4.2.5 Dosagem da atividade enzimática	34
4.2.6 Síntese do éster emoliente	36
4.5.7 Determinação do teor de umidade	41
4.5.8 Rendimento de esterificação	41
4.5.9 Produtividade	42

4.5.10 Purificação e caracterização do miristato de isopropila.....	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1 Estabelecimento do método de análise para determinação do teor do miristato de isopropila.....	44
5.2 Atividades enzimáticas dos biocatalisadores sintetizados	45
5.3 Síntese do miristato de isopropila	46
5.3.1 Síntese do miristato de isopropila conduzida em frascos agitados em modo descontínuo.....	46
5.3.1.1 Desempenho da lipase de <i>Candida rugosa</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.....	46
5.3.1.2 Desempenho da lipase de <i>Penicillium camemberti</i> imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila	50
5.3.2 Síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operado em modo contínuo.....	59
5.3.2.1 Testes preliminares para adequação da razão molar (ácido:álcool) na síntese do miristato de isopropila	59
5.3.2.2 Estudo da orientação do fluxo de alimentação no biorreator de leito fixo operado continuamente em simples estágio	61
5.3.2.3 Estudo da vazão de alimentação no biorreator de leito fixo operado continuamente em simples estágio	64
5.3.2.4 Síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo em duplo estágio com coluna extratora de água.....	68
5.3.3 Síntese do miristato de isopropopila conduzida em biorreator de tanque agitado operado de modo descontínuo.....	71
5.4 Purificação e caracterização do miristato de isopropila.....	74
6. CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

De acordo com o ABIHPEC (associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético) a indústria de cosméticos nos últimos 18 anos mostrou um crescimento acelerado, em média de 9,8% ao ano. O mercado de cosméticos pode ser dividido em 5 grandes áreas: cuidados com a pele (*Skincare*), cuidados com o cabelo, maquiagem, fragrância e produtos de higiene. Dentre os produtos orgânicos utilizados nas formulações de cosméticos, os ésteres são os que têm a maior gama de aplicação como: emolientes em cremes hidratantes, surfactantes em shampoos e antioxidantes em cremes de *anti aging*. (GORCEA; LAURA 2013; NISHAT; VIRENDRA, 2015).

Ésteres emolientes são formados por cadeias carbônicas longas, não são tóxicos, são biodegradáveis, e possuem uma boa solubilidade em gordura, sendo responsáveis por manter a maciez, plasticidade, hidratação e restauração da oleosidade da pele (VADGMA; ODANETH; LALI, 2015).

A globalização e a competitividade do mundo moderno exigem que as indústrias operem seus processos com rendimento e produtividade cada vez maiores aliados a um baixo impacto ao meio ambiente (NISHAT; VIRENDRA, 2015). É nesse contexto que a aplicação de enzimas para a produção de ésteres se enquadra. Pois, elas empregam condições de processo mais amenas, como temperaturas (entre 30~ 70°C) e pressões mais baixas (KHAN; RATHOD, 2015).

Dentre as enzimas pode-se destacar as lipases, que são capazes de catalisar várias reações como a hidrólise de óleos e gorduras, reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. A lipase pode ser obtida por meio de animais, fungos, plantas e bactérias (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; SALIHU; ALAM, 2015).

Segundo Castro et al. (2010), reações que utilizam enzimas livres como biocatalisador apresentam algumas desvantagens como: dificuldade de recuperação da enzima, devido a solubilidade ao meio reacional e instabilidade à temperatura e ao pH. Para solucionar tais problemáticas, a técnica de imobilização de enzimas vem sendo cada vez mais estudada e utilizada.

Dentre as matrizes de imobilização de enzimas podemos destacar o suporte híbrido magnético, pois segundo estudos de Bento (2017) ele vem apresentando resultados bem satisfatórios. Essa matriz apresenta algumas vantagens tais como:

elevada área superficial, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas, baixa resistência a transferência de massa e facilidade de separação das partículas magnéticas (VERMA; BARROW; PURI, 2013).

Nesse contexto o presente trabalho visou à obtenção de um produto de interesse comercial (éster emoliente) via esterificação enzimática, empregando lipases imobilizadas em partículas poliméricas magnetizadas, conduzida em diferentes configurações de biorreatores, visando determinar as condições ótimas de síntese.

Para esta finalidade foram testadas diferentes fontes de lipases microbianas, como *Candida rugosa*, *Penicillium camemberti* e *Candida antarctica* imobilizadas em STY-DVB-M e diferentes sistemas e/ou configurações de biorreatores, visando obter os maiores rendimentos, concentrações e produtividades do miristato de isopropila.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar éster emoliente por meio de reações de esterificação catalisadas por lipases imobilizadas em suportes magnéticos, empregando diferentes configurações de biorreatores.

2.2 Objetivos específicos

✓ Sintetizar o suporte à base de estireno por polimerização em suspensão magnetizado por partículas de magnetita preparadas por co-precipitação dos ions Fe^{2+} e Fe^{3+} ;

✓ Imobilizar as lipases microbianas *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Penicillium camembertii* pela técnica de adsorção física no copolímero magnetizado sintetizado;

✓ Sintetizar o miristato de isopropila a partir de reações de esterificação conduzidas em diferentes tipos de biorreatores e modo de condução, empregando os biocatalisadores obtidos;

✓ Determinar as condições ótimas para a síntese do miristato de isopropila.

✓ Purificar e caracterizar o éster obtido.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Biotecnologia

O desenvolvimento da biotecnologia vem crescendo de forma constante e expressiva no Brasil, isso tanto na área de produção de bens como na área de pesquisa. No entanto, há muitas lacunas na compreensão dos aspectos econômicos, social e político (FREIRE; 2011).

Segundo Bianchi (2018) as indústrias de biotecnologia estão concentradas nos estados de São Paulo e Minas Gerais e há uma previsão de investimentos, até 2020, de 1 bilhão de dólares, o que significa que 20% dos produtos químicos serão derivados de biotecnologia.

Segundo Pessôa (2019) há muito o que se estudar na área da biotecnologia, uma vez que, o processo ainda é muito caro se comparado aos métodos convencionais. Assim, antes da implementação do bioprocessamento é necessário um estudo detalhado em relação às suas variáveis, bem como quanto ao tipo de catalisador e biorreator ideal (STERGIOU et al., 2013).

3.2 Enzima

São macromoléculas de proteínas compostas por uma sequência de aminoácidos ligados por ligações peptídicas. Cada enzima possui uma forma estrutural particular e característica, como ilustrada na Figura 1, que configura a cada enzima uma função característica (BUGG, 2013). As enzimas são catalisadores biológicos que tem como função reduzir a energia de ativação de uma reação química, ou seja, aumentar a velocidade da reação (NELSON; COX, 2011; SAID; PIETRO, 2014).

Nos seres vivos as enzimas são responsáveis pelos processos bioquímicos, catalisando diferentes etapas das várias reações que degradam ou sintetizam as moléculas dos nutrientes, conservando e transformando a energia química, sendo necessárias em todos os sistemas vivos, tanto para a sobrevivência como para a reprodução (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; NELSON; COX, 2014).

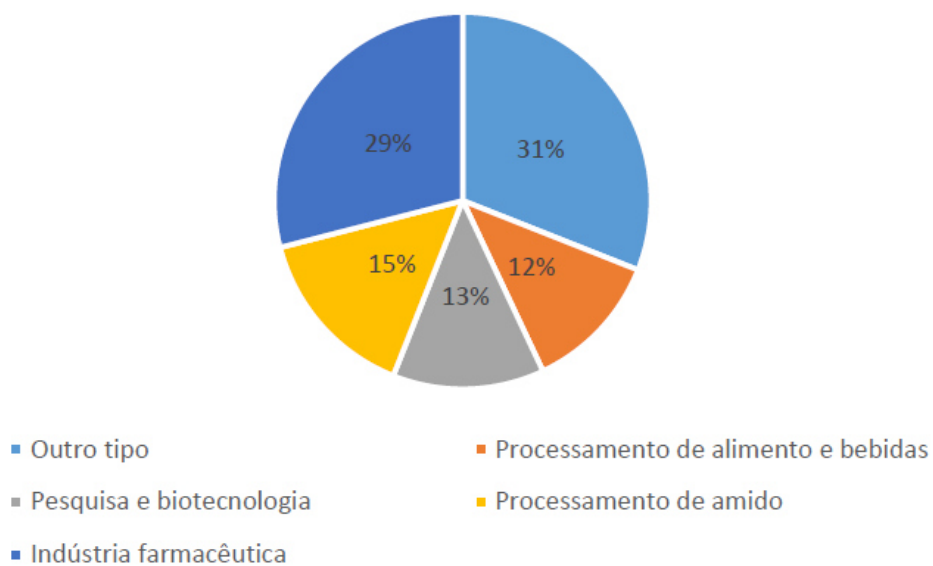
Figura 1 - Estrutura tridimensional da lipase de *Candida antarctica*.



Fonte: (POPPE, 2015)

Segundo estudos dos grupos da BCC, o mercado global deve crescer de US\$ 16 bilhões, em 2018, para US\$ 24,8 bilhões, em 2023. Dentre as enzimas utilizadas as que mais se destacam são a celulose (17,1%) e a lipase (7,2%). Segundo Ferreira et al. (2011), essas enzimas são empregadas em diferentes áreas, conforme ilustra a Figura 2.

Figura 2 - Distribuição da demanda de enzimas industriais em diferentes áreas.



Fonte: Adaptado (FERREIRA, et al. 2011)

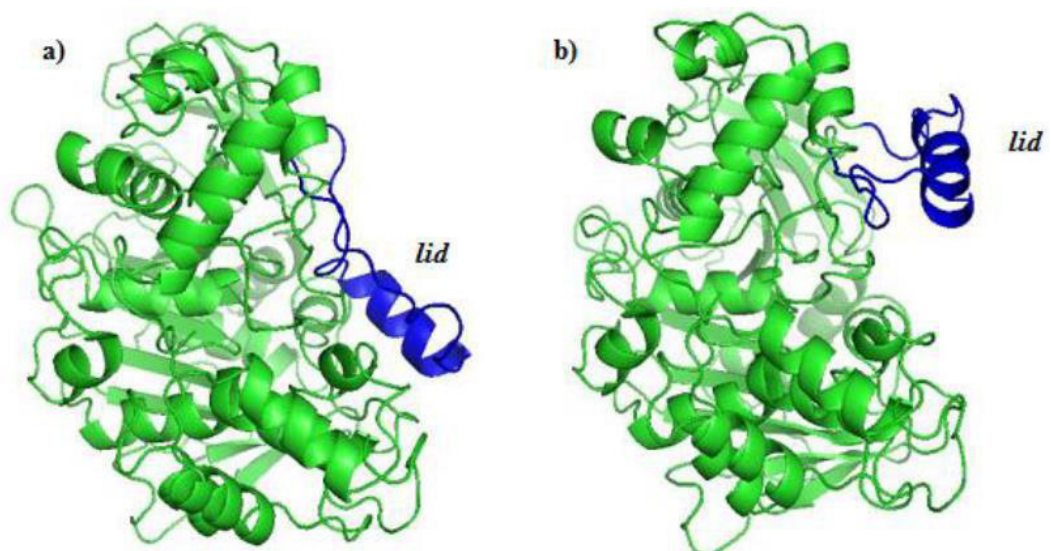
3.3 Lipase

As lipases apresentam uma vasta gama de possibilidades de aplicação industrial (TREVISAN, 2014), uma vez que, são responsáveis pela catálise da hidrólise de óleos e gorduras, além de catalisarem reações de esterificação, transesterificação e interesterificação. São encontradas de forma abundante na natureza sendo obtidas por fontes renováveis como fungos, animais, plantas e bactérias (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; SALIHU, ALAM, 2015).

Segundo estudos de Hasan, Shah e Hammed (2006) as lipases em um substrato aquoso, apresentam baixa atividade. O aumento dessa atividade só é observado quando a concentração do substrato supera o limite de solubilidade e ocorre a separação da fase lipídica e aquosa.

Esse fenômeno é explicado pela geometria tridimensional da lipase (Figura 3), na qual o sítio ativo da enzima é coberto por uma cadeia peptídica denominada tampa (*lid*), de natureza hidrofóbica. Quando a tampa encontra uma interface lipídeo-água, há interações entre ambas e está sofre uma alteração conformacional na qual a tampa se move, alterando a forma fechada da enzima para a forma aberta, expondo assim o site ativo (MESSIAS, et al. 2011).

Figura 3 - Conformação do lid da lipase de *Candida antarctica* (a) "tampa" aberta (b) "tampa" fechada.



Fonte: (RODRIGUES, 2009)

O quadro 1 mostra diferentes áreas industriais nas quais a lipase B de *Candida antarctica* vem sendo utilizada.

Quadro 1 - Áreas de atuação da lipase de *Candida antarctica*

Área de atuação	Referência
Compostos opticamente ativos na indústria farmacêutica	GOTOR-FERNÁNDEZ et al., 2006.
Ésteres do ácido levulínico que apresenta características comuns aos aditivos usados na gasolina.	SZELWICKA et Al., 2020.
Síntese do Biodiesel por transesterificação do óleo de mamona	CRUZ JÚNIOR, A., 2007.
Síntese de ésteres de vitaminas A	SILVA, J. A., 2007.
Síntese do miristato de isopropila	SILVA, M. V. C. et al, 2018.

Fonte: Próprio autor

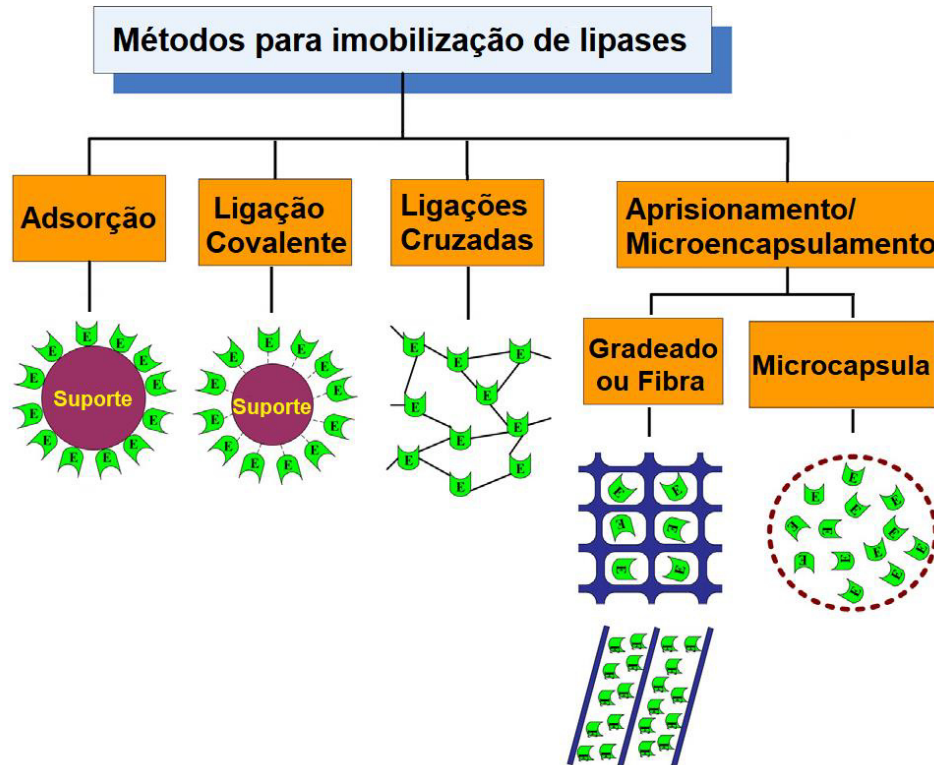
3.4 Métodos de imobilização de enzimas

Enzimas imobilizadas são as que estão fisicamente confinadas ou localizadas em uma certa região do espaço (GUISAN, 2013). A imobilização tem como objetivo a redução do custo do processo enzimático, uma vez que, a enzima torna-se mais estável, ampliando sua faixa de temperatura e de pH; facilita a separação do meio reacional, permitindo assim sua reutilização; além de permitir o uso contínuo do processo, visto que o biocatalisador pode ser retido no interior do biorreator (ZANIN; MORAES, 2014).

As enzimas podem ser imobilizadas por duas maneiras diferentes, conforme ilustrado na Figura 4:

- 1) No interior de um suporte por meio da encapsulação ou aprisionamento.
- 2) Na superfície de um suporte por meio de adsorção física reversível, ligações iônicas ou covalentes.

Figura 4 - Principais métodos de imobilização de lipases



Fonte: Modificado (ZHAO et al., 2015)

Dentre os métodos de imobilização podem ser destacados:

1) Ligação covalente: A metodologia é baseada na ativação de grupos químicos do suporte para que reajam com os nucleófilos das proteínas da enzima. Esse tipo de ligação é muito estável e de caráter covalente (RODRIGUES, 2009).

2) Adsorção física: Ligação fraca do tipo interações de Van der Waals. Para a utilização desse tipo de ligação é necessário que o material (suporte) seja poroso para facilitar a fixação da enzima ao suporte (CHANG et al., 2007). Para o sucesso deste tipo de imobilização, algumas variáveis devem ser otimizadas como, pH, temperatura, tipo de solvente e concentração de enzima. Podem ser utilizados uma vasta variedade de suportes para a imobilização de enzimas, podendo ser de natureza orgânica ou inorgânica, tais como cerâmica, alumina, carvão ativado, polímeros, celulose, quitosana, bentonita, entre outros (DWEVEDI, 2016).

Dentre as vantagens deste método, destacam-se: a) o suporte não necessita de ativação; b) processo de baixo custo; c) possível recuperação do suporte; d)

pouca ou nenhuma alteração da conformação da enzima e e) preservação da atividade catalítica da enzima (DWEVEDI, 2016).

3) Ligação cruzada: Envolve a formação de diversas ligações covalentes das moléculas de enzima entre si, a partir da utilização de agentes de ligação multifuncionais, tais como glutaraldeído e glioxal. Geralmente, os grupos responsáveis pelas ligações são as aminas de lisina, hidroxilas fenólicas de tirosina e imidazol de histidina. Este método não utiliza matrizes sólidas como suporte, pois as enzimas são ligadas entre si por meio de agentes de ligação. As principais vantagens deste método são a sua simplicidade, a retenção da atividade catalítica enzimática e a simplificação das operações de purificação e imobilização das enzimas (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; DWEVEDI, 2016).

3.5 Suporte de imobilização de enzima

Diversos materiais orgânicos e inorgânicos podem ser utilizados como suporte para imobilização de enzimas, contudo a seleção da matriz ideal deve seguir uma série de critérios em relação às suas propriedades, aplicações e custo. Geralmente o suporte deve ser insolúvel ao meio reacional, ter elevada resistência química e à microrganismos, e possuir diâmetro de poros adequados (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

Os suportes podem ser classificados de acordo com a sua fonte de origem e estrutura química, conforme apresentado no Quadro 2.

Dentre os materiais orgânicos os polímeros merecem destaque, podendo ser sintéticos ou naturais, apresentando diversas formas físicas e estruturais. A vantagem em se utilizar polímero sintético é que este pode ser combinado com outros elementos para adquirir as características desejadas. Os polímeros naturais apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis, não causando danos ao meio ambiente (DELLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004).

Quadro 2 - Classificação dos materiais utilizados para a imobilização de enzimas.

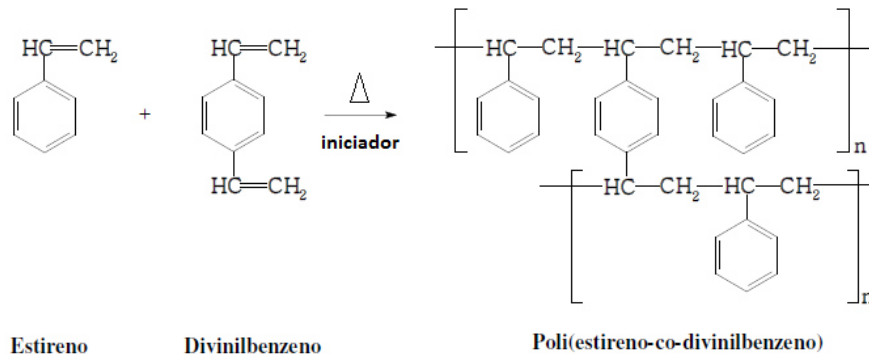
Classificação	Tipo	Exemplos
Orgânico	Polímeros naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Polissacarídeos: celulose, agar, agarose, dextranas • Proteínas: colágeno, albumina • Carbono
	Polímeros sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Poli(estireno-co-divinilbenzeno) • Poliacrilatos • Polimetacrilatos • Poliamidas • Poliacrilamidas
Inorgânico	Minerais naturais	<ul style="list-style-type: none"> • Bentonita • Sílica
	Materiais sintéticos	<ul style="list-style-type: none"> • Vidro (com e sem poros controlados) • Metais • Óxidos metálicos com poros controlados

Fonte: (GUISAN, 2013)

3.5.1 Poli(estireno-co-divinilbenzeno)

É um polímero obtido por copolimerização em suspensão do estireno (STY) com divinilbenzeno (DVB) (OLIVEIRA; ALVEZ; CASTRO, 2000). O polímero pode apresentar características do tipo gel sem a presença de poros, inviabilizando dessa forma a imobilização de enzimas por adsorção. No entanto, a adição de solventes ao polímero, pode contrair poros tornando-se viável a sua imobilização (GARCIA-DIEGO; CUELLAR, 2005; LIMA, 2013). A estrutura do polímero em questão, pode ser observada na Figura 5.

Figura 5 - Esquema representativo da formação do Poli(estireno-co-divinilbenzeno) a partir dos monômeros de estireno e divinilbenzeno.



Fonte: (BENTO, 2015)

Bento (2015) utilizou esse polímero magnetizado para imobilizar a lipase de *Candida rugosa* por adsorção física, obtendo bons resultados na síntese do butirato de butila. Além disso, encontrou os seguintes parâmetros cinéticos: $V_{\text{máx}} = 5870 \text{ U g}^{-1}$ e $K_m = 1766 \text{ mmol L}^{-1}$.

O Quadro 3 ilustra alguns exemplos de trabalhos que utilizaram o poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases

Quadro 3 - Utilização do poli(estireno-co-divinilbenzeno) como suporte para imobilização de lipases.

Lipase	Método de imobilização	Produto de interesse	Referência
<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção física	Biodiesel a partir de óleo de soja e etanol (transesterificação)	CASTIGLIONI et al., 2016.
<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Adsorção física	Biodiesel a partir de óleo de soja	Poppe, J. K. et al., 2014.
<i>Candida rugosa</i>	Adsorção física	Diversos ésteres butílicos (esterificação)	SANTOS et al., 2007.
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ligação covalente	Biodiesel a partir de óleo de canola e metanol (transesterificação)	DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2009.

Fonte: Adaptado (SILVA, 2017)

3.5.2 Polímero híbrido magnético

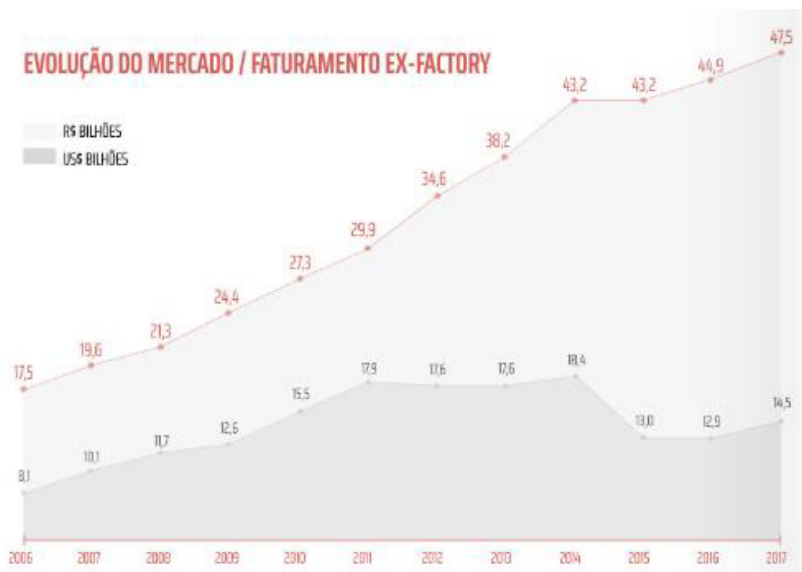
São formados basicamente por uma matriz polimérica ligada geralmente com a magnetita, que dá ao composto uma propriedade magnética. Uma das vantagens ecológicas de compostos magnéticos é a baixa toxicidade e a fácil obtenção (DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012). Esses compostos apresentam algumas vantagens para a imobilização de enzimas (DUSSÁN; CARDONA; GIRALDO, 2012; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; VERMA; BARROW; PURI, 2013; DE CASTRO, 2008):

- Elevada área superficial;
- Torna a enzima mais estável;
- Facilidade de separação do meio reacional;
- Possibilidade de uso em reatores enzimáticos.

3.6 Indústria de cosméticos

De acordo com os estudos da indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos (ABIHPEC) houve um crescimento expressivo do faturamento da indústria de cosméticos conforme mostra a Figura 6. Em 10 anos de registros (2007-2017), é possível observar crescimentos superiores a 100%.

Figura 6 - Evolução da indústria de cosméticos no Brasil.



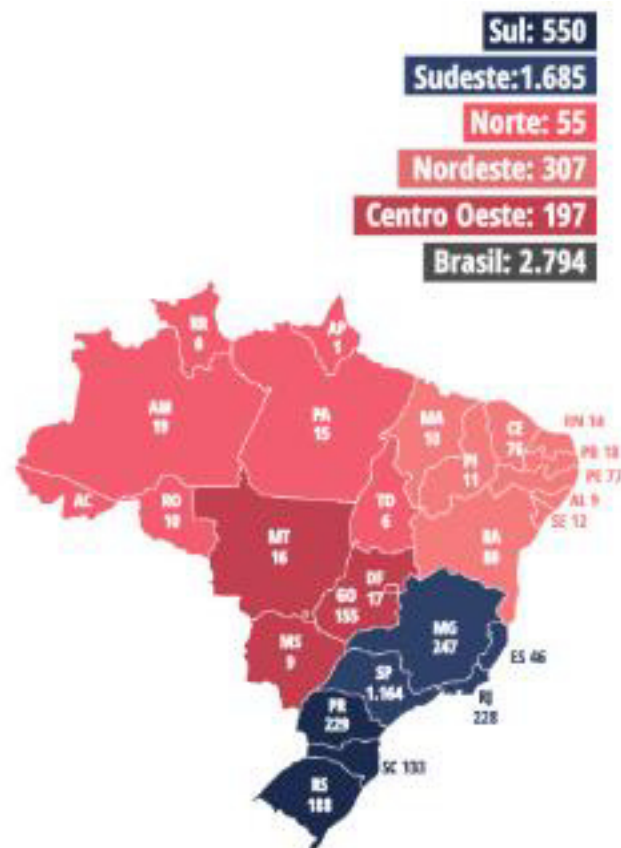
Fonte: (ABIHPEC, 2018)

No Brasil, segundo estudos da ABIHPEC de 2019, existem 2.794 empresas que atuam na área de cosméticos, sendo 16 de grande porte (faturamento acima de U\$\$ 100 milhões), e essas empresas estão distribuídas conforme Figura 7.

Atualmente uma importante fusão de duas gigantes da indústria da beleza ocorreu, a Natura comprou ações da Avon transformando-se na Natura &co a quarta maior indústria de cosméticos, e segundo o Estadão essa nova empresa pretende injetar 349 milhões de reais, mostrando com isso que haverá um crescimento expressivo no ramo de cosméticos (BRASIL, 2019).

No mercado de cosméticos um dos seguimentos mais importantes são os dos ésteres emolientes, pois apresentam as seguintes características: não são tóxicos, são biodegradáveis, apresentam boa solubilidade em gordura, são responsáveis por manter a maciez, plasticidade, hidratação e restauração da oleosidade da pele e podem ser empregados em formulações skincare (KHAN; RATHOD, 2015).

Figura 7 - Empresas atuantes no mercado de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos no Brasil.



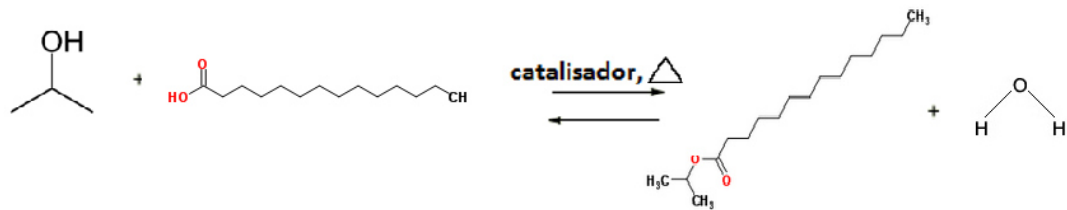
Fonte: (ABIHPEC, 2019)

3.7 Miristato de Isopropila

O miristato de isopropila é classificado como éster emoliente, que são ésteres de ácido graxo com cadeia longa, geralmente variando entre C12 a C18. Eles apresentam uma propriedade lubrificante e por isso são muito utilizados em formulação de produtos cosméticos, principalmente para o mercado de *skincare*. (CHOI et al., 2015).

Em condições normais de temperatura e pressão o miristato de isopropila é um líquido incolor, transparente e inodoro. O éster é obtido pela reação de esterificação do ácido mirístico com o álcool isopropílico conforme mostrado na Figura 8.

Figura 8 - Esquema representativo da formação do miristato de isopropila a partir da esterificação do ácido mirístico e álcool isopropílico.



Fonte: Próprio autor

O miristato de isopropila é muito utilizado na indústria de cosméticos como um substituto de óleos naturais, pois tem uma excelente espalhabilidade e absorção pela pele. Em métodos convencionais a síntese do miristato de isopropila emprega catalisadores químicos e altas temperatura, resultando em um produto final com cor e odor indesejável, necessitando de etapas para purificação (VADGMA; ODANETH; LALI, 2015).

3.8 Biorreatores

São equipamentos na qual ocorre transformações bioquímicas com auxílio de biocatalisadores que podem ser enzimas ou células microbianas. No entanto, cada agente biológico que irá catalisar a reação requer condições específicas e ótimas

elas podem ser determinadas através de um planejamento de experimento (PERREIRA JR, 2008).

Para selecionar o biorreator adequado é necessário que se conheça alguns parâmetros, tais como: cinética da reação, engenharia de bioprocessos, balanço de massa e energia, transferência de massa e calor entre outros (NAJAFPOUR, 2007).

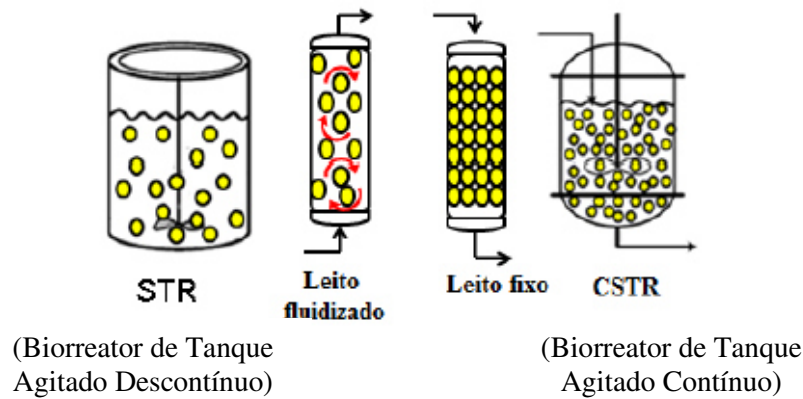
O sucesso de reações conduzidas em biorreatores que empreguem enzimas imobilizadas como catalisador depende da análise de alguns fatores (ZANIN; MORAES, 2014):

- Forma da enzima imobilizada;
- Natureza do substrato;
- Requisitos operacionais, tais como pH;
- Cinética da reação;
- Superfície catalítica por unidade de volume;
- Características de transferência de massa interna;
- Facilidade de substituição do biocatalisador;
- Facilidade de operação;
- Custo da construção do biorreator.

Os tipos de biorreatores mais comumente utilizados (Figura 9) são: biorreator de tanque agitado, biorreator tubular de leito fixo ou fluidizado e biorreatores de membranas, sendo os tubulares os mais empregados. Em alguns processos pode ocorrer a combinação destes tipos reatores, sendo necessário um planejamento de experimento para determinar as condições ótimas do processo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

A conversão adequada do substrato depende das seguintes condições: quantidade e atividade do biocatalisador (baseada na taxa máxima da velocidade de reação); o tempo de reação ou tempo espacial e a concentração do substrato (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012).

Figura 9 - Modelo de biorreatores para aplicações com enzima imobilizadas.



Fonte: (ZANIN; MORAES, 2014).

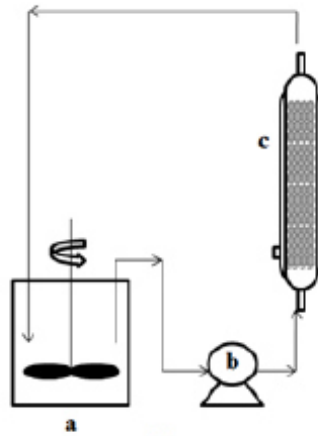
Para o desenvolvimento desse trabalho foram selecionados para a síntese do éster emoliente os reatores de tanque agitado operado de modo descontínuo e os reatores de leito fixo operados de modo contínuo.

3.8.1 Biorreator de Leito fixo

O biorreator de leito fixo mostrado na Figura 10, é um sistema reacional na qual as enzimas estão imobilizadas e empacotadas em uma coluna, enquanto o substrato é bombeado através do leito. Esse tipo de biorreator é muito utilizado devido a sua alta eficiência, baixo custo de operação e facilidade de construção (AGUIEIRAS; CALVACANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; AMINI et al., 2017).

Um dos parâmetros fundamentais para o emprego desta configuração de biorreator é tempo de reação (tempo espacial), que é determinado pela vazão do substrato e o volume do biorreator. A vazão deve ser ajustada a fim de se encontrar uma condição ótima de conversão do substrato em produto (POOPE et al., 2015).

Figura 10 - Esquema de um biorreator de leito fixo com uma coluna: a) Reservatório de substrato; b) Bomba peristáltica; c) Coluna empacotada.



Fonte: Adaptado (WANG ET AL., 2014)

Segundo Agueira; Calvacanti-Oliveira e Freire (2015), esse sistema apresenta algumas vantagens:

- Alta conversão por unidade de massa de biocatalisador;
- Evita quebra do biocatalisador;
- Elevada razão entre enzima e substrato;
- Facilidade de reciclagem da enzima utilizada;
- E alta eficiência energética.

Outro ponto importante a ser observado é a viscosidade do substrato e o tamanho das partículas do biocatalisador, pois um substrato muito viscoso e um biocatalisador com partículas muito pequenas podem causar uma queda de pressão no biorreator, inviabilizando a sua operação (AGUIEIRAS; CALVACANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015).

3.8.2 Biorreator de tanque agitado

Os reatores de tanque agitado são os mais utilizados industrialmente e por isso os mais utilizados. Apresentam resultados satisfatórios para uma vasta gama de bioprocessos. Esse tipo de biorreator vem sendo muito utilizado na indústria farmacêutica, pois diferentes produtos podem ser obtidos a partir do mesmo equipamento (PEREIRA JR, 2008).

O reator de tanque agitado apresenta algumas desvantagens, como a grande demanda de energia para a agitação mecânica, são de difícil escalonamento e precisam ser cuidadosamente projetados para produzir uma mistura adequada. Industrialmente, o reator de tanque agitado é utilizado em dois modos de operação: contínuo e descontínuo (BUCHHOLZ; KASCHE; BORNSCHEUER, 2012; PEREIRA JR, 2008).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materias

A seguir estão apresentados os materiais utilizados para a realização do presente trabalho.

4.1.1 Síntese do copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado

Para a recristalização da Azobisisobutironitrila (AIBN) foram utilizados: água ultrapura, álcool polivinílico – PVA 88% hidrolisado – MM 78000 (Polysciences, Inc.), Azobisisobutironitrila - AIBN (MIG Química), divinilbenzeno 80% (Sigma-Aldrich®), estireno 99% (Sigma-Aldrich®), heptano 95% (Cromoline), metanol 99,8% (Cromoline), e toluol 99,5% (Cromoline).

4.1.2 Síntese e modificação da magnetita

Acetato de etila 99,5% (Cromoline) água ultra pura, hidróxido de sódio 99% (Synth), cloreto de ferro (II) tetrahidratado 99% (Sigma-Aldrich®), cloreto de ferro (III) pentahidratado 97% (Sigma-Aldrich®), ácido oleico P.A (Cromoline) e etanol 96% (Cromoline).

4.1.3 Imobilização das enzimas

Foram utilizadas preparações comerciais de lipase microbiana de *Candida antarctica* (CALB), *Candida rugosa* e de *Penicillium camembertii* adquiridas na sua forma livre, da Sigma-Aldrich®. Também foram utilizados: polietilenoglicol - PEG MM 1500 (Synth) e heptano 95% (Cromoline).

4.1.4 Quantificação da atividade sintética (esterificação) e atividade hidrolítica

Acetona (Cromoline), ácido oleico P.S (Cromoline), água destilada, butirato de metila 99,5% (Sigma-Aldrich®), diidrogenofosfato de potássio 99% (Cromoline),

hidrogenofosfatodissódico 99% (Synth), hidróxido de potássio 85% (Synth), e etanol 96% (Cromoline).

4.1.5 Síntese dos padrões cromatográficos do miristato de isopropila

Cloreto de tionila 99,5% (Merck), Benzeno 99,8% (Sigma-Aldrich), sódio metálico (Merck), ácido mirístico P.S. 99% (Cromoline) e álcool isopropílico 99,5% (Cromoline).

4.2 Métodos

4.2.1 Síntese do suporte

Os copolímeros magnetizados foram sintetizados a partir da técnica de polimerização em suspensão, empregando uma fase orgânica e uma fase aquosa. A fase orgânica é composta por estireno e agente reticulante (fase dispersa) e solução aquosa de álcool polivinílico como fase aquosa e agente de suspensão (fase contínua). À essa mistura também foram adicionados toluol como solvente de alta afinidade e heptano como solvente de baixa afinidade, AIBN como iniciador, e magnetita modificada. Os reagentes foram adicionados à um reator mantido à 70 °C por 6 horas sob agitação mecânica e atmosfera inerte de nitrogênio. Após a polimerização, o meio contendo as partículas de copolímero será filtrado a vácuo e lavado com água UP à temperatura ambiente e água UP aquecida na temperatura de 50 °C, acetona e etanol, para remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C por 18 h e peneirado para classificação granulométrica.

4.2.2 Síntese da Magnetita

A co-precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3} foi realizada a partir da mistura de soluções aquosas de FeCl_2 0,6 mol L^{-1} e de $\text{FeCl}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,1 mol L^{-1} , em um béquer imerso em banho maria, sob agitação mecânica. A temperatura do meio reacional foi estabilizada a 65 °C e solução aquosa de NaOH 4 mol L^{-1} foi adicionada lentamente

ao meio, até atingir pH 11,0. A solução de coloração negra formada foi mantida sob agitação por 30 min a 65 °C seguido de repouso sobre um imã para auxiliar a decantação das partículas magnéticas precipitadas na reação. A massa negra decantada foi separada e lavada sucessivamente com água UP e solução 1:1 de acetato de etila e água UP até atingir pH 7,0. O fluido férrico contendo as partículas magnéticas foi filtrado a vácuo e levado à estufa a 60 °C por 18 h (BENTO et al., 2017).

4.2.3 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico

A magnetita seca foi misturada sob agitação constante em ácido oleico numa proporção 1:0,81 (m/v) de magnetita:ácido oleico. Em seguida foram adicionados 25 mL de água para cada 1 g de partículas magnéticas, sendo a mistura mantida sob agitação por 30 min. A emulsão formada foi filtrada a vácuo e lavada com etanol para remover o ácido oleico residual. As partículas magnéticas modificadas foram levadas à estufa a 60 °C por 18h para completa secagem, e então adicionadas à polimerização (LEE; RHO; JUNG, 2003).

4.2.4 Imobilização das lipases no suporte polimérico magnetizado

O suporte foi embebido em heptano e mantido sob agitação por 2 horas em Shaker. Após esse período, o excesso de heptano foi removido e para cada grama de suporte foi adicionado 100 µL de PEG e 0,25 g ou 250 µL de enzima. O meio foi homogeneizado com um bastão de vidro e deixado em repouso por 18 horas a 4°C. A recuperação do derivado foi efetuada por filtração a vácuo com lavagem sucessiva com heptano até a redução da umidade com valores inferiores a 10%.

4.2.5 Dosagem da atividade enzimática

Foram utilizadas duas metodologias para a dosagem de atividade dos biocatalisadores estudados no presente trabalho. Isso se deve às particularidades de cada enzima avaliada, como por exemplo, a lipase de *Candida antarctica* não apresenta atividade de hidrólise, sendo necessário a utilização de outra metodologia para determiná-la.

4.2.5.1 Dosagem da atividade hidrolítica

O método utilizado para dosar a atividade hidrolítica foi o método da hidrólise do butirato de metila, conforme metodologia descrita por Fidalgo et al. (2014). Em erlenmeyers de 125 mL foram adicionados 30 mL de tampão fosfato 25 mmol L⁻¹ pH 7 e 300 µL de butirato de metila. A mistura foi acondicionada em shaker a 45 °C e 200 rpm. Foram adicionados 0,05 g de biocatalisador de lipase imobilizada e a reação ocorreu durante 10 minutos. Após esse tempo foram adicionados 10 mL de solução etanol-acetona 1:1 (v/v) e a mistura foi titulada com KOH 0,05 mol L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador. A atividade hidrolítica foi calculada de acordo com a Equação 1.

$$A = \frac{(V_a - V_b) \cdot C \cdot 1000}{t \cdot m} \quad (\text{Eq.1})$$

Em que: A = atividade hidrolítica (U g⁻¹), V_a = volume de solução de KOH utilizado na titulação da amostra (mL); V_b = volume de solução de KOH utilizado na titulação do branco (m); C = concentração em quantidade de matéria da solução de KOH (mol L⁻¹); t = tempo de reação (min); e m = massa de biocatalisador utilizado (g).

Uma unidade de atividade hidrolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de ácido butírico por minuto de reação sob as condições do ensaio.

4.2.5.1 Dosagem da atividade sintética

A atividade sintética (esterificação) do biocatalisador obtido pela imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado, foi realizada a partir da síntese do oleato de etila, conforme metodologia modificada de Pinto et al. (2014). Foram transferidos para um frasco de vidro com capacidade de 100 mL, 11,1 mL de ácido oleico, 1,9 mL de etanol anidro e 0,5 de biocatalisador. O frasco foi acondicionado em *shaker* durante 1 hora a temperatura de 50 °C e agitação de 200 rpm, sendo retiradas amostras de

0,1 mL em tempos pré-determinados. Uma unidade de atividade enzimática de esterificação (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 μ mol de oleato de etila por minuto de reação sob as condições do ensaio. A atividade sintética foi determinada apenas na região linear do gráfico: concentração do produto *versus* unidade de tempo.

4.2.6 Síntese do éster emoliente

As sínteses foram realizadas via esterificação enzimática, empregando como matéria-prima ácido mirístico e álcool isopropanol, além da lipase imobilizada em copolímero magnetizado como biocatalisador. As reações foram conduzidas em frascos agitados, reator de tanque agitado e reator de leito fixo, sendo conduzidas em modo contínuo e descontínuo. As sínteses foram acompanhadas pela retirada de alíquotas em tempos pré-determinados para quantificação do consumo do ácido e quantificação do éster formado por cromatografia em fase gasosa.

4.2.6.1 Reação de esterificação realizada em frascos agitados conduzida em modo descontínuo

As reações de esterificação conduzidas em frascos agitados, foram realizadas em shaker em potes de vidro de 100 ml, contendo 20 ml de substrato e 12,5% m/v de biocatalisador para as lipases de *Candida rugosa* e *Penicillium camemberti* e 4% m/v para a lipase de *Candida antarctica*, ressaltando-se que essa proporção utilizada, foi baseada em estudos previamente realizados pelo grupo. As reações foram conduzidas por 24 horas e a influência da temperatura e da razão molar na síntese do éster, foi avaliada para todos os biocatalisadores testados.

Para a determinação do ponto ótimo, foi realizado um planejamento de experimento 2^2 estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, sendo adotadas as condições experimentais descritas nas Tabelas de 1 a 4.

- *Candida rugosa* e *Penicillium camemberti*

Tabela 1 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimento para avaliar o desempenho da lipase de *Candida rugosa* e de *Penicillium camemberti* imobilizadas em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.

Variáveis		Níveis				
Reais	Codificadas	- α (-1,414)	-1	0	1	+ α (1,414)
Temperatura (°C)	A	35,9	38	43	48	50,1
Razão molar (ácido:álcool)	B	1:2,20	1:1,25	1,65:1	2,5:1	2,85:1

Fonte: Próprio autor

Tabela 2 - Matriz experimental realizada para avaliar o desempenho da lipase de *Candida rugosa* e de *Penicillium camemberti* imobilizadas em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.

Ensaio	Temperatura (° C)	Razão Molar (ácido: álcool)
1	48,0	1:1,25
2	38,0	1:1,25
3	43,0	1:2,20
4	48,0	2,50:1
5	38,0	2,50:1
6	43,0	2,85:1
7	50,1	1,65:1
8	35,9	1,65:1
9	43,0	1,65:1
10	43,0	1,65:1
11	43,0	1,65:1

Fonte: Próprio autor

Tabela 3 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento de experimento para avaliar o desempenho da lipase de *Candida antarctica* immobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.

Variáveis		Níveis				
Reais	Codificadas	- α (-1,414)	-1	0	1	+ α (1,414)
Temperatura (°C)	A	35,9	40	50	60	64,1
Razão molar (ácido:álcool)	B	1:2,20	1:1,25	1,65:1	2,5:1	2,85:1

Fonte: próprio autor

Tabela 4 - Matriz experimental realizada para avaliar o desempenho da lipase de *Candida antarctica* immobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila.

Ensaio	Temperatura (° C)	Razão Molar (Ácido/ Álcool)
1	40,0	1:1,25
2	60,0	1:1,25
3	50,0	1:2,20
4	60,0	2,50:1
5	50,0	2,50:1
6	50,0	2,85:1
7	64,1	1,65:1
8	35,9	1,65:1
9	50,0	1,65:1
10	50,0	1,65:1
11	50,0	1,65:1

Fonte: próprio autor

4.2.6.2 Reação de esterificação realizada em reatores de leito fixo conduzida em modo contínuo

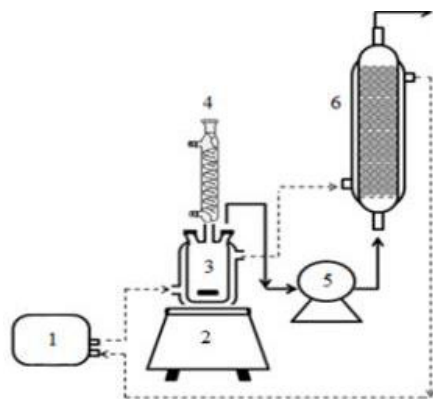
Os testes em biorreator de leito fixo foram efetuados em coluna de vidro encamisada, confeccionada por empresa especializada (Diogolab – Vidraria para laboratório), medindo 166 mm de altura e 11 mm de diâmetro interno, correspondendo a um volume de 15,8 mL. Essa relação entre a altura/diâmetro da

coluna foi baseada em trabalhos realizados anteriormente (DAMSTRUP et al., 2007; RAMOS et al., 2014).

A alimentação foi realizada com o auxílio de uma bomba peristáltica (Sci-Q 400, Watson-Marlow). Para compor o aparato experimental também foram utilizados os seguintes equipamentos: aquecedor (AB 1200, Britânia), banho termostatzado (Banho Ultratermostatzado Criostato, Nova Ética), agitador magnético (752, Fisatom) e resistências flexíveis (2m/25W, KW Resistências Elétricas). As vazões de alimentação utilizadas foram de 0,010 e 0,025mL/min, correspondendo a 20 e 8h de tempo espacial, respectivamente.

As mangueiras e as conexões utilizadas foram constituídas de marprene (Watson-Marlow) apresentando as seguintes especificações: 1,6 x 1,6 mm; 4,8 x 1,6 mm; 8,0 x 1,6 mm e 9,6 x 2,4 mm. A reação foi conduzida dentro de uma “estufa de madeira” para que a temperatura permanecesse em torno de 50 °C. A Figura 11 representa o esquema experimental utilizado para a síntese do miristato de isopropila em biorreator de leito fixo.

Figura 11 – Esquema do biorreator de leito fixo para a síntese do miristato de isopropila: 1 – Banho termostatzado; 2 – Agitador magnético; 3 – Reservatório de substrato; 4 – Condensador; 5 – Bomba peristáltica; 6 – Coluna de vidro.



Fonte: (Silva, 2017)

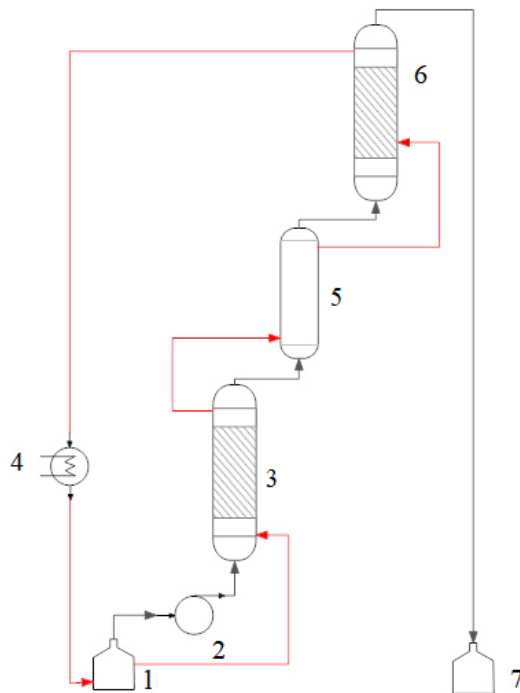
4.2.6.2 - Reação de esterificação realizada em reatores de leito fixo em duplo estágio empregando coluna extratora de água, conduzida em modo contínuo

A fim de deslocar o equilíbrio da reação para a favorecer a síntese do éster, pensou-se em remover a água formada na reação de esterificação (Princípio de Lê

Chatelier). Para essa finalidade, foi utilizada uma configuração de reatores empacotados em duplo estágio, empregando uma coluna extratora de água (contendo peneira molecular) entre os biorreatores, conforme ilustra a Figura 12.

O sistema experimental foi composto por 02 colunas de vidro encamisada (biorreatores), medindo 166 mm de altura e 11 mm de diâmetro interno, correspondendo a um volume de 15,8 mL (Diogolab) e uma coluna extratora com volume total de 9,7 mL (15mm de diâmetro interno e 55mm de altura), contendo 10,75 g de peneira molecular ativada. A vazão de alimentação empregada foi de 0,04 mL/min, correspondendo à um tempo espacial de 10h.

Figura 12 - Aparato experimental para biorreator de leito fixo de duplo estágio com coluna extratora de umidade. Em que: 1 – Reservatório de substrato; 2 – Bomba peristáltica; 3 – Primeiro estágio de coluna de vidro; 4 – Banho termostatzado; 5 – Coluna extratora de água; 6 – Segundo estágio de coluna de vidro; 7 – Reservatório de produto.

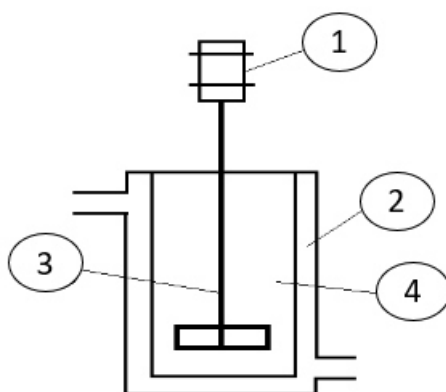


Fonte: Próprio autor

4.2.6.3 - Reação de esterificação realizada em tanque agitado conduzido em modo descontínuo

O reator utilizado foi composto por vidro encamisado, com volume total de 150 mL. A reação foi realizada empregando razão molar de 1:5 (ácido : álcool) ,4% m/v de biocatalisador e sobre agitação de 300 rpm. A Figura 13, ilustra o esquema experimental simplificado para a síntese do miristato de isopropila em biorreator de tanque agitado.

Figura 13 - Esquema do biorreator de tanque agitado para a síntese do miristato de isopropila: 1 – Agitador mecânico; 2 – Camisa de aquecimento; 3 – Impelidor tipo turbina de pá fina aberta; 4 – Biorreator.



Fonte: Próprio autor.

4.5.7 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade do AIBN e dos biocatalisadores foi realizada em balança analítica acoplada com infravermelho (MOC63u, Shimadzu) durante 3 min a 105 °C. A umidade do éster formado na esterificações foi determinada em Titulador Karl Fisher (AKF5000, Koehler).

4.5.8 Rendimento de esterificação

O desempenho das sínteses do éster emoliente foi expresso em termos de rendimento de esterificação. O cálculo do rendimento foi baseado na proporção estequiométrica do éster sintetizado (Equação 2).

$$\text{Rendimento de esterificação (\%)} = \left(\frac{C_{\text{éster}}}{C_i} \right) \cdot 100 \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: C_i = Concentração inicial do reagente limitante (ácido oleico ou 2-etilhexanol) no substrato (mmol L^{-1}) e $C_{\text{éster}}$ = Concentração do éster em um determinado tempo de reação de esterificação (mmol L^{-1}).

4.5.9 Produtividade

O cálculo da produtividade em éster obtida nos processos enzimáticos foi realizado empregando-se a Equação 3.

$$\text{Produtividade (\text{mmol g}^{-1} \text{L}^{-1} \text{h}^{-1})} = \frac{C_{\text{éster}}}{\tau \cdot m} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: $C_{\text{éster}}$ = é a concentração em éster formada na reação de esterificação em mmol L^{-1} , τ = é o tempo espacial em horas e m = é a massa de biocatalisador empacotado na coluna do biorreator em gramas.

4.5.10 Purificação e caracterização do miristato de isopropila

Para a purificação do miristato de isopropila, primeiramente foi realizada uma filtração à vácuo para que o biocatalisador fosse separado do meio reacional. O meio reacional, que continha ácido mirístico e álcool isopropílico não reagido, a água e o éster formado, foi levado à um rotaevaporador à temperatura 65°C , sob vácuo de $1,5 \text{ mmHg}$. O aparato experimental está representado na Figura 14.

Após a purificação do éster foram calculados alguns parâmetros importantes para futuras aplicações do mesmo, como viscosidade, densidade e umidade.

A viscosidade foi calculada à 40°C com a utilização de 1 mL da amostra, por meio de um viscosímetro Brookfield Modelo LVDVII (Brookfield Viscometers Ltd, Inglaterra).

A densidade foi obtida com o auxílio de um balão volumétrico de 1 mL e uma balança analítica. Primeiramente o balão volumétrico foi pesado e em seguida, foi completado com o miristato de isopropila até o menisco. Posteriormente o balão foi

novamente pesado e então, a diferença das massas resultou na massa do éster, conforme mostra a Equação 4.

$$\rho = \frac{M}{V} \quad (\text{Eq. 4})$$

Em que ρ = densidade (g.mL^{-1}); M = Massa (g) e V = Volume (mL)

A umidade foi determinada no Karl Fischer (AKF5000, Koehler) conforme descrito na sessão 4.5.7.

Figura 14 - Aparato experimental empregado para purificação do miristato de isopropila.



Fonte: Próprio autor

5.RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estabelecimento do método de análise para determinação do teor do miristato de isopropila

O método de análise para quantificação do teor do éster miristato de isopropila foi realizado em um cromatógrafo gasoso PerkinElmer® - Modelo Clarus 580, equipado com uma coluna capilar com recheio composto de 5% difenilo e 95% dimetilpolisiloxano, revestida por fibra de vidro e detector de ionização de chama (FID). Os fluxos dos gases para alimentação do detector foram mantidos em 400 mL min⁻¹ de ar sintético e 40 mL min⁻¹ de H₂. O N₂ utilizado como gás de arraste (fluxo de variando de 0,2 a 1,0 mL min⁻¹). Tanto o detector e o injetor foram mantidos a 250 °C.

O método de análise foi iniciado com uma isoterma à 105 °C por 7 minutos e vazão de N₂ de 0,2 mL min⁻¹. Posteriormente, as duas rampas de aquecimento foram estabelecidas: 20 °C /min até atingir 200 °C, mantendo-se constante por 1 min e 25 °C/min até atingir 280 °C, mantendo-se constante por 2 minutos, totalizando um tempo de 17,95 minutos de análise (Tabela 5).

O volume injetado foi de 1 µL de uma mistura de 1:1 da amostra com o padrão interno (8,0 g L⁻¹ de hexanol em meio heptano).

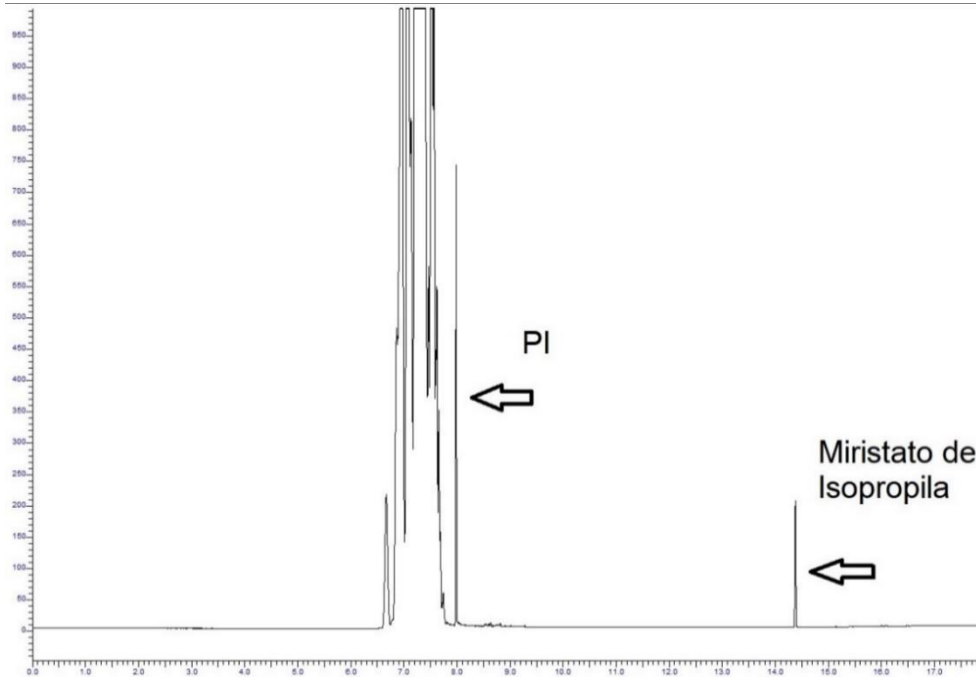
Tabela 5 - Condições de operação estabelecidas para o método de dosagem do miristato de isopropila.

Temperatura (°C)	Taxa de aquecimento (°C min ⁻¹)	Tempo (min)	Vazão do gás de arraste (mL min ⁻¹)
105	-	7	0,2
105-200	20	-	1,0
200	-	1	1,0
200-280	25	-	1,0
280	-	2	1,0

Fonte: Próprio autor

A Figura 15 apresenta o cromatograma obtido após o estabelecimento do método para a quantificação do miristato de isopropila. O tempo de retenção do padrão interno (PI) foi de 7,97 min e do miristato de isopropila foi de 14,37 min.

Figura 15 - Cromatograma obtido para quantificação do miristato de isopropila.



Fonte: Próprio autor

5.2 Atividades enzimáticas dos biocatalisadores sintetizados

O suporte de poli(estireno-co-divinilbenzeno) magnetizado (STY-DVB-M) na faixa granulométrica entre 80 a 24 mesh foi utilizado para imobilizar as lipases selecionadas de *Candida rugosa* (LCR), *Penicillium camemberti* (Lipase G) e lipase de *Candida antactica* (CAL B).

A Tabela 6 mostra os valores de atividade catalítica obtidos pelos derivados imobilizados, tanto pela atividade de esterificação, como também pela hidrólise do butirato de metila.

Tabela 6 - Atividade de esterificação dos biocatalisadores obtidos pela imobilização das lipases imobilizadas em STY-DVB-M.

Biocatalisador	Atividade de esterificação (U g⁻¹)	Atividade de hidrólise (U g⁻¹)
<i>Candida rugosa</i>	121,01 ± 20,61	nc
<i>Candida antarctica</i>	1815,67 ± 75,74	479,12 ± 14,35
<i>Penicillium camemberti</i>	279,86 ± 5,52	nc

*nc: não quantificado

Fonte: Próprio autor

Dentre os derivados imobilizados, observa-se que a lipase de *Candida antarctica* se destaca, uma vez que, apresenta a maior atividade de esterificação, sendo indicada pela literatura como adequada para sínteses. A quantificação da atividade hidrolítica da lipase G (*Penicillium camemberti*) não foi possível, visto que esta lipase não hidrolisa óleos e gorduras.

5.3 Síntese do miristato de isopropila

5.3.1 Síntese do miristato de isopropila conduzida em frascos agitados em modo descontínuo

5.3.1.1 Desempenho da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila

Visando determinar as melhores condições para a síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M, foi verificada a influência da temperatura e da razão molar, por meio de um planejamento estatístico 2² estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central, conforme mostra a Tabela 7 e anteriormente na seção de Materiais e Métodos.

Tabela 7 – Rendimentos obtidos nos ensaios pela lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila em 9 horas de reação.

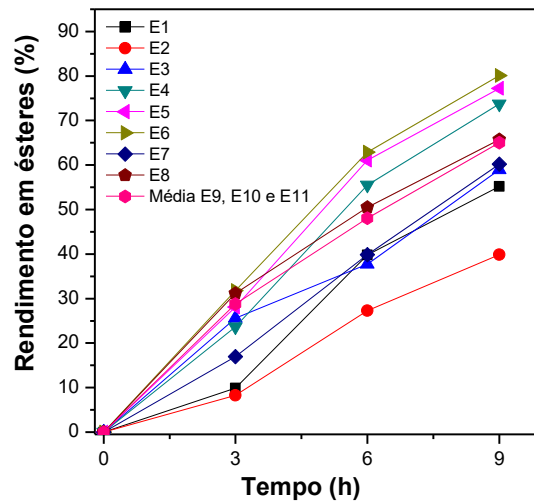
Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (Ac:Al)	Rendimento (%)
1	48	1:1,25	55,17
2	38	1:1,25	39,83
3	43	1:2,20	58,97
4	48	2,50:1	73,71
5	38	2,50:1	77,23
6	43	2,85:1	80,13
7	50,1	1,65:1	60,22
8	35,9	1,65:1	65,70
9	43	1,65:1	65,01
10	43	1,65:1	67,49
11	43	1,65:1	62,58

Fonte: Próprio autor

A Figura 16 ilustra o perfil do rendimento em cada ensaio realizado, na qual é possível observar que os melhores rendimentos foram obtidos para os ensaios 5, 6 e 7, atingindo um máximo de 80% em 9 horas de reação (Tabela 7). Estes teste foram realizados com as razões molares mais elevadas previstas no planejamento estatísticos e sob temperaturas variadas.

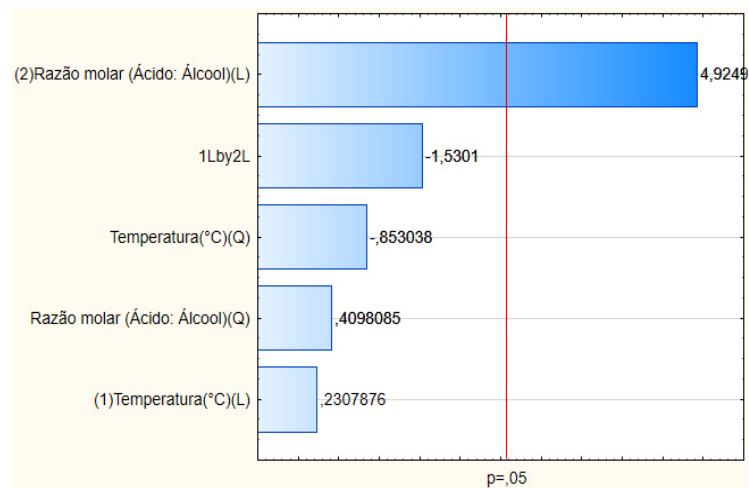
Para a realização da análise estatística foram empregados os softwares Statistica versão 12 12 (StatSoft Inc., USA) e Design-Expert 10.0 (Stat-Ease Corporation, USA). A Figura 17 mostra o gráfico de Pareto obtido pela análise estatística, apresentando como efeito significativo apenas o termo linear da razão molar (4,92), constatando que o excesso do ácido graxo favorece a síntese do éster e que a temperatura não é significativa para a síntese do miristato de isopropila. Esse fato pode ser explicado devido à imobilização da lipase no copolímero magnético ter conferido à enzima uma maior estabilidade térmica (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

Figura 16 - Perfil dos rendimentos teóricos obtidos para os ensaios realizados a partir da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M.



Fonte: Próprio autor

Figura 17 - Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do miristato de isopropila.



Fonte: Próprio autor

A Tabela 8 apresenta a análise de variância (ANOVA), cujo modelo estatístico proposto (equação 5), mostrou-se significativo ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste.

A Figura 18 ilustra a superfície de resposta gerada a partir dos dados estatísticos obtidos, na qual é possível notar que os maiores valores de rendimentos teóricos foram obtidos na região com razões molares (ácido:álcool) superiores a 2:1 e temperaturas mais amenas em torno de 40°C.

Tabela 8 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando LCR imobilizada em suporte STY-DVB-M.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
Modelo	1058,51	5	211,70	5,57	0,0413*
A-Temperatura	2,02	1	2,02	0,05	0,8266
B- Razão Molar	921,65	1	921,65	24,26	0,0044*
AB	88,96	1	88,96	2,34	0,1865
A²	27,65	1	27,65	0,73	0,4326
B²	6,38	1	6,38	0,17	0,6989
Resíduo	189,99	5	38,00		
Falta de Ajuste	177,96	3	59,32	9,86	0,0935
Erro Puro	12,03	2	6,02		
Cor Total	1248,50	10			

Fonte: Próprio autor

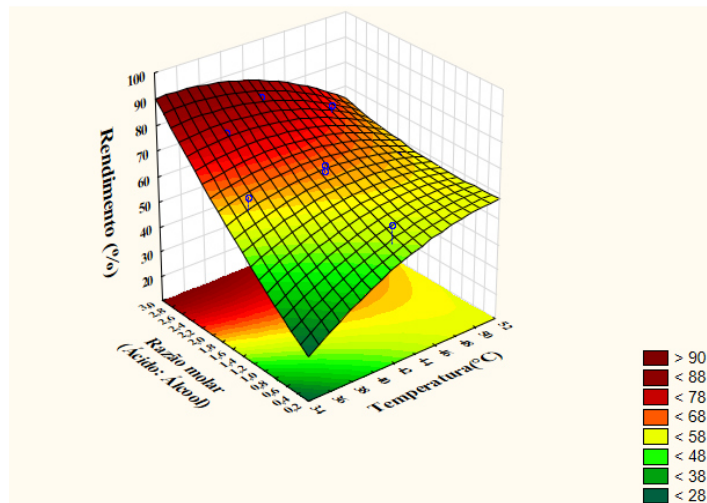
$$Y = - 197,4716 + 9,49469*A + 55,4819*B - 1,10964*A*B - 0,087947*A^2 + 1,47605*B^2 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que: Y representa o rendimento teórico da reação, A é o valor codificado da variável temperatura (°C) e B é o valor codificado da variável razão molar.

Com auxílio do software estatístico Design-Expert 10.0, foi possível encontrar a condição ótima de razão molar e temperatura para a obtenção do maior rendimento na síntese do miristato de isopropila. As condições experimentais ótimas indicadas foram: razão molar (ácido:álcool) de 2,79:1 e temperatura de 39,0°C, tendo como resposta um rendimento de 84,57%.

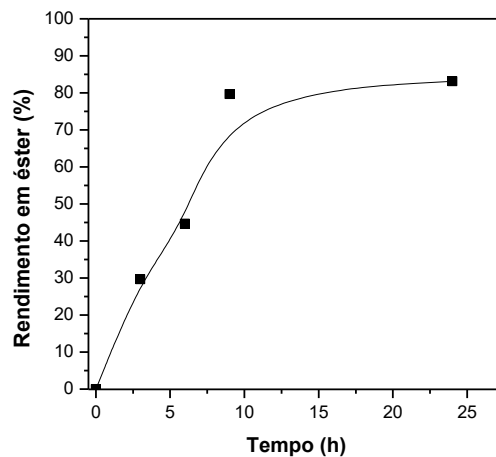
Para a confirmação do modelo, foi realizado um ensaio nessas condições, que atingiu 83,10% de rendimento em 9 horas de reação, apresentando um desvio em relação ao valor predito do modelo de 1,74%, considerado plenamente satisfatório (Figura 19).

Figura 18 - Superfície de resposta obtida pela análise estatística empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor

Figura 19 - Confirmação do modelo estatístico obtido a partir da lipase de *Candida rugosa* imobilizada em STY-DVB-M.



Fonte: Próprio autor

5.3.1.2 Desempenho da lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila

Para a análise da síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase *Penicillium camemberti*, também foram analisadas as variáveis razão molar e temperatura, empregando o planejamento de experimento 2^2 estrela rotacional.

A Tabela 9 mostra os parâmetros empregos para a síntese do miristato de isopropila empregando a lipase de *Penicullium camembert* imobilizada em STY-DVB-M (matriz experimental). Foram realizados 11 ensaios experimentais com temperatura variando de 35,9 °C até 50,1 °C. Nota-se que a faixa de temperatura empregada para esta enzima é superior à outras lipases, como também relatado por Vilas Boas (2018), que utilizou temperaturas entre 40 °C e 50 °C para essa mesma lipase.

Na mesma tabela podemos observar os resultados de cada experimento, nela é possível constatar quais foram os rendimentos alcançados a partir de cada ensaio experimental. O ensaio 5 apresentou o maior rendimento com temperatura de 38° C e razão molar de 2,5 Acido: Álcool.

Tabela 9 – Rendimentos obtidos nos ensaios pela lipase de *Penicullium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila em 9 horas de reação.

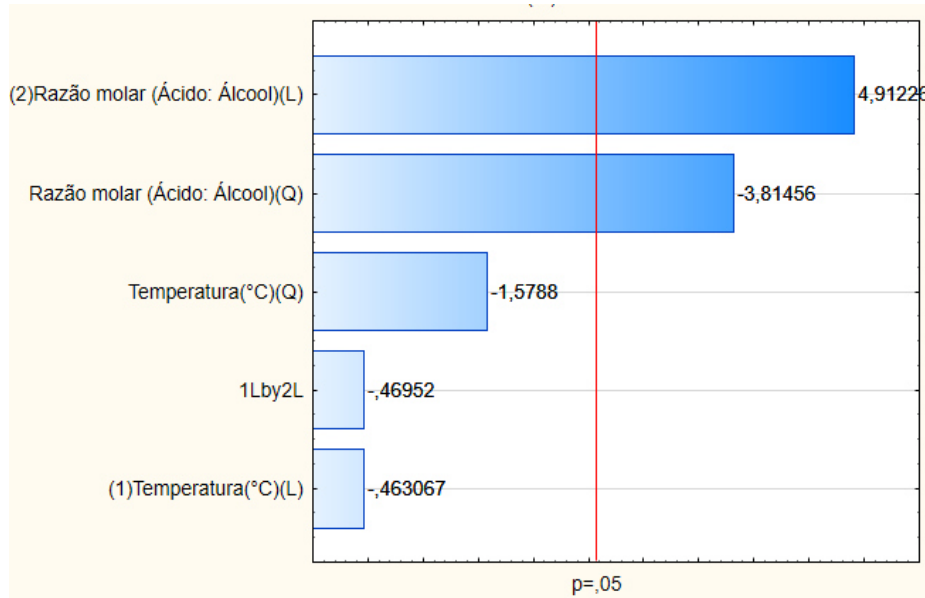
Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (Ac:Al)	Rendimento (%)
1	48	1:1,25	86,42
2	38	1:1,25	80,56
3	43	1:2,20	97,67
4	48	2,50:1	70,88
5	38	2,50:1	93,25
6	43	2,85:1	87,46
7	50,1	1,65:1	87,53
8	35,9	1,65:1	83,48
9	43	1,65:1	86,21
10	43	1,65:1	82,22
11	43	1,65:1	83,57

Fonte: próprio autor

A Figura 20 mostra o Pareto obtido para a síntese do miristato de isopropila, utilizando a lipase G imobilizada em STY-DVB-M, constatando-se que apenas os efeitos linear e quadráticos da razão molar foram significativos, ou seja, que o excesso do ácido influencia de forma positiva o rendimento das reações de esterificação para os testes realizados. E similarmente ao resultado obtido pela LCR,

a temperatura não é significativa, confirmando a adequação da técnica de imobilização utilizada, que proporcionou maior estabilidade à enzima.

Figura 20 - Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando lipase G imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do miristato de isopropila.



Fonte: próprio autor

A Tabela 10 apresenta a análise de variância (ANOVA), cujo modelo estatístico proposto (equação 6), mostrou-se significativo ao nível de 95% de confiança, constatando-se falta de ajuste para o modelo. No entanto, decidiu-se testar a condição ótima indicada pelo modelo matemático.

A Figura 21 ilustra a superfície de resposta a partir dos dados estatísticos obtidos, na qual é possível notar que os maiores formações do éster foi obtido nas maiores razões molares (excesso de ácido) e temperaturas medianas (43 °C).

Para a confirmação do modelo, foi realizado um ensaio na condição ótima apontada pelo modelo, que atingiu 86,34% de rendimento em 24 horas de reação (Figura 22).

Tabela 10 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando lipase G imobilizada em suporte STY-DVB-M.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
Modelo	3010,25	5	602,05	7,86	0,0205*
A-Temperatura	63,08	1	63,08	0,82	0,4055
B- Razão Molar	1403,59	1	1403,59	18,34	0,0078*
AB	16,86	1	16,86	0,22	0,6585
A²	190,72	1	190,72	2,49	0,1752
B²	1113,39	1	1113,39	14,55	0,0124
Resíduo	382,58	5	76,51		
Falta de Ajuste	374,33	3	124,77	30,25	0.0322
Erro Puro	8,24	2	4,12		
Cor Total	3392,84	10			

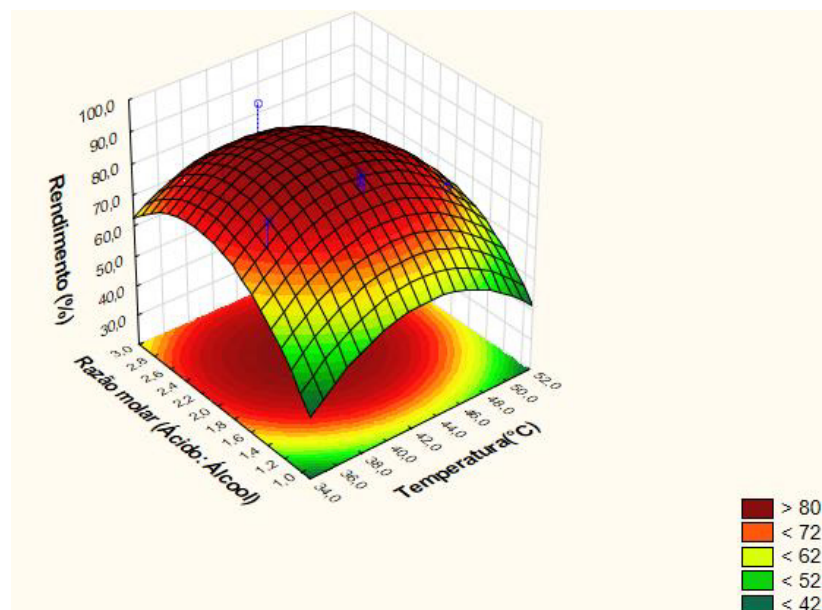
Fonte: Próprio autor

$$Y = + 83,26 + 2,17 * A + 16,23 * B - 1,03 * A * B - 1,44 * A^2 - 14,09 * B^2$$

(Eq.6)

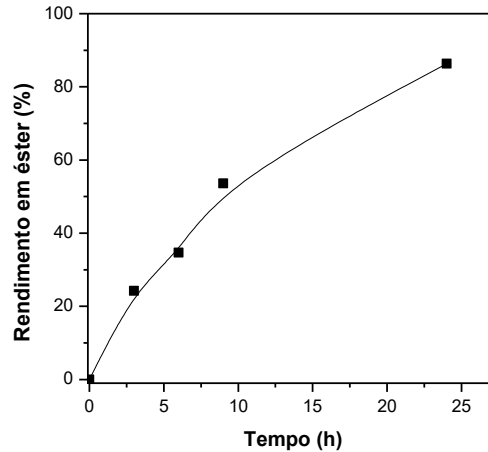
Em que: Y representa o rendimento teórico da reação, A é o valor codificado da variável temperatura (°C) e B é o valor codificado da variável razão molar.

Figura 21 - Superfície de resposta obtida pela análise estatística empregando LCR imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio autor

Figura 22 - Confirmação do modelo estatístico obtido a partir da lipase de *Penicillium camemberti* imobilizada em STY-DVB-M.



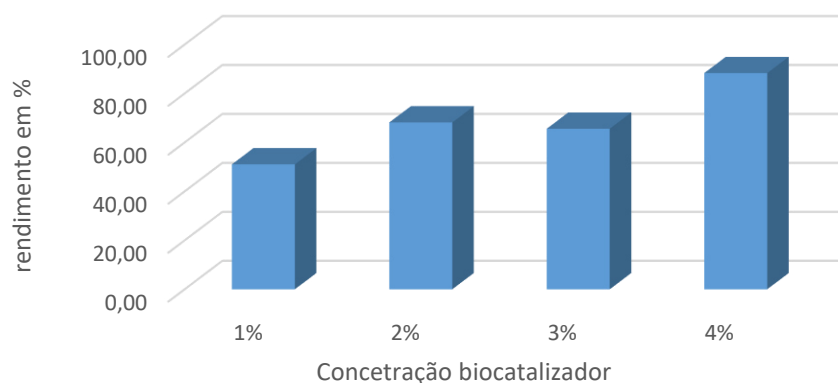
Fonte: Próprio autor

5.3.1.3 Desempenho da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila

Como a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M apresentou uma atividade de esterificação muito elevada, julgou-se necessário, inicialmente, realizar alguns testes, com o intuito de determinar a quantidade adequada deste biocatalisador para as reações de esterificação. A Figura 23 ilustra os experimentos realizados, empregando 1%, 2%, 3% e 4% do biocatalisador na síntese do miristato de isopropila. Esses testes foram realizados empregando-se razão molar de 2,5:1 e temperatura de 39 °C, para 2 horas de reação.

Observa-se que, o aumento da quantidade de biocatalisador no meio reacional, proporciona uma elevação no rendimento da reação. E de acordo com trabalho realizado por Raajeshkumar; Annamma; Arvind (2015), 4% m/v de biocatalisador foi melhor concentração testada. Além disso, nesse mesmo trabalho, os autores verificaram que temperaturas um pouco mais elevadas que as que foram testadas até o presente momento, favoreciam a reação de esterificação. Sendo assim, a variável temperatura foi elevada para a realização do planejamento de experimento empregando a Cal B imobilizado no suporte polimérico magnético.

Figura 23 - Rendimentos obtidos para a síntese do miristato de isopropila empregando diferentes concentrações de lipase de *Candida antarctica* imobilizada em suporte STY-DVB-M.



Fonte: Próprio autor

Então, para verificar a influência da temperatura e da razão molar na síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M, foi realizado um planejamento de experimento 2^2 estrela rotacional com 4 pontos axiais e 3 replicatas no ponto central. As variáveis, bem como a matriz experimental, pode ser observada na Tabela 11. Conforme o estudo demonstrando, a massa do derivado para essas reações foi de 4% m/v.

A Tabela 11 e a Figura 24 mostram os rendimentos obtidos em cada ensaio realizado, empregando a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M. Podemos observar que a enzima obteve bons resultados mesmo em temperaturas mais elevadas ($64,1\text{ }^{\circ}\text{C}$) conforme descrito também na pesquisa realizada por Raajeshkumar; Annamma; Arvind (2015).

Pode-se observar na Figura 24 que nos primeiros 30 min a reação teve sua máxima velocidade. Isso se deve ao fato da elevada concentração de substrato no início da reação, sendo observada uma estabilização dessa velocidade, devido à formação do éster e da água.

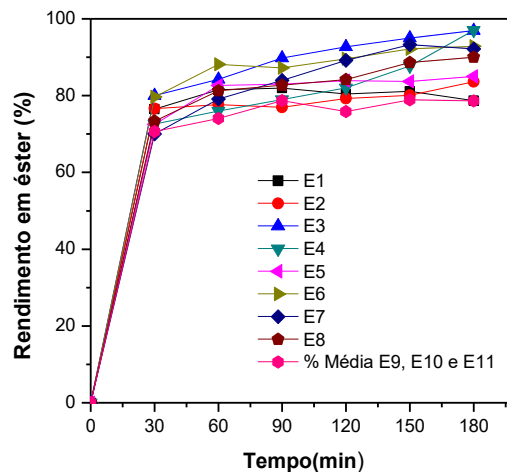
Os melhores rendimentos observados foram obtidos nos ensaios 5 e 6, que são os experimentos em que testou-se as maiores concentrações molares de ácido, mostrando uma correlação entre o excesso do ácido e o rendimento da reação.

Tabela 11 - Rendimentos experimentais obtidos nos ensaios pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M na síntese do miristato de isopropila em 9 horas de reação.

Ensaio	Temperatura (°C)	Razão Molar (Ac:Al)	Rendimento (%)
1	40,0	1:1,25	81,51
2	60,0	1:1,25	77,63
3	50,0	1:2,20	84,24
4	60,0	2,50:1	80,09
5	40,0	2,50:1	88,12
6	50,0	2,85:1	88,12
7	64,1	1,65:1	79,11
8	35,9	1,65:1	81,26
9	50,0	1,65:1	74,77
10	50,0	1,65:1	74,01
11	50,0	1,65:1	72,18

Fonte: Próprio autor

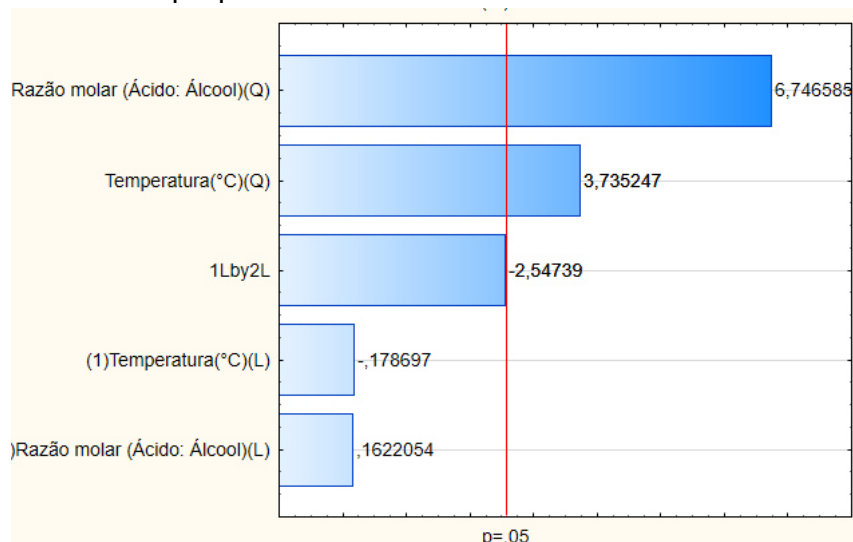
Figura 24 - Perfil dos rendimentos teóricos obtidos para os ensaios realizados a partir da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M.



Fonte: Próprio autor

No gráfico de Pareto (Figura 25) é possível notar que além da razão molar, a temperatura também é significativa, diferentemente das outras lipases utilizadas nesse trabalho. Isso pode ser explicado, em função de que nesses ensaios, as temperaturas empregadas foram mais elevadas que nos outros planejamentos.

Figura 25 - Gráfico de Pareto do rendimento da reação de esterificação empregando lipase *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador para a síntese do miristato de isopropila.



Fonte: Próprio autor

A Tabela 12 representa a análise de variância (ANOVA), cujo modelo estatístico proposto (Eq. 7), mostrou-se significativo ao nível de 95% de confiança, não sendo constatada falta de ajuste.

A Figura 26 ilustra a superfície de resposta gerada a partir dos dados estatísticos, em que é possível notar que os melhores rendimentos foram obtidos quando empregou-se excesso de um dos reagentes, o que desloca o equilíbrio da reação, e favorece a formação do éster.

As condições experimentais ótimas indicadas foram: razão molar (ácido:álcool) de 2,5:1 de razão molar (álcool:ácido) e temperatura de 40°C, tendo como resposta um rendimento de 87,51%. Na Figura 27 está apresentada a confirmação do modelo, na qual observa-se um rendimento de 83,60% em apenas 3h de reação.

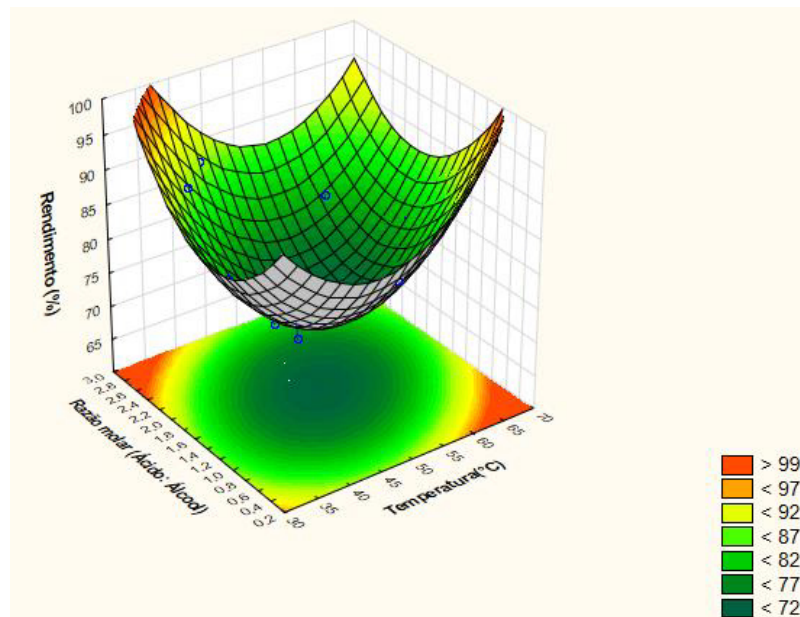
Tabela 12 - ANOVA dos resultados obtidos a partir do planejamento de experimentos utilizando *Candida antarctica* imobilizada em suporte STY-DVB-M.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Grau de Liberdade	Média Quadrática	F	P
Modelo	203,314	5	40,662	9,905	0.0125
A-Temperatura	11,220	1	11,220	2,733	0.1592
B- Razão Molar	10,297	1	10,297	2,508	0.1741
AB	0,449	1	0,449	0,109	0.7541
A²	37,449	1	37,449	9,122	0.0294
B²	175,820	1	175,820	42,829	0.0012
Resíduo	20,525	5	4,105		
Falta de Ajuste	16,981	3	5,660	3,194	0.2475
Erro Puro	3,544	2	1,772		
Cor Total	223,839	10			

Fonte: Próprio autor

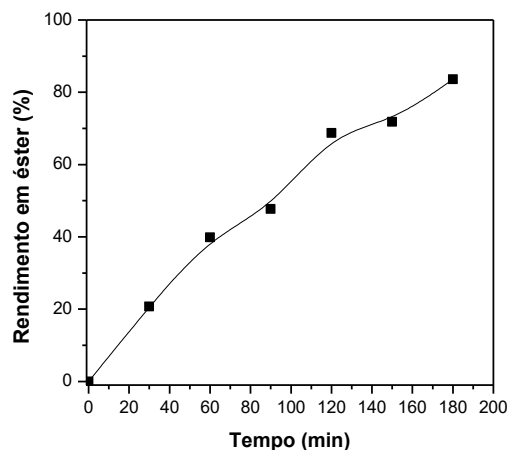
$$Y = +166,3666 - 2,7698A - 26,1770B + 0,0394AB + 0,0259A^2 + 7,7397B^2 \quad (\text{Eq7})$$

Figura 26 - Superfície de resposta obtida pela análise estatística empregando a lipase Cal B imobilizada em STY-DVB-M como biocatalisador.



Fonte: Próprio Autor.

Figura 27 - Confirmação do modelo estatístico obtido a partir da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M.



Fonte: Próprio Autor.

Resultados similares foram obtidos por Alves et al. (2014), que estudando o desempenho da lipase Cal B na síntese do acetato de butila, constataram que os rendimentos mais elevados foram obtidos empregando a razão molar de 3,46: 1 (álcool: ácido), obtendo um rendimento de 90% em 1,5 horas, ou seja, foi favorecida pelo excesso de álcool.

Esse resultado difere dos obtidos pelas demais lipases testadas nesse trabalho, que apresentaram melhor desempenho em condições que havia excesso de ácido. Uma possível justificativa para essa observação, pode estar relacionada com alguma característica particular dessa lipase, a qual o excesso do álcool não inibe seu poder catalítico.

5.3.2 Síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operado em modo contínuo

5.3.2.1 Testes preliminares para adequação da razão molar (ácido:álcool) na síntese do miristato de isopropila

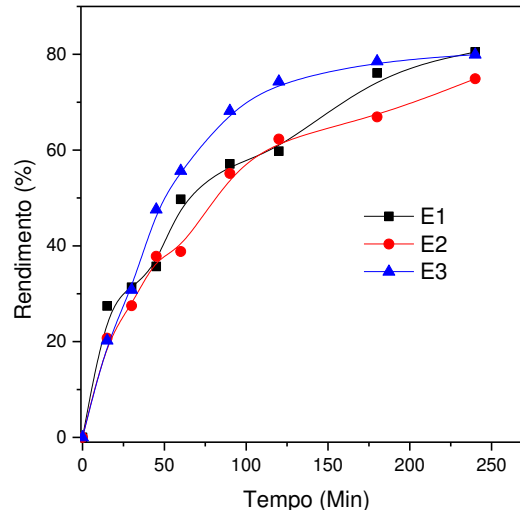
Visando selecionar uma condição experimental que possibilitasse a síntese contínua do éster em biorreator de leito fixo em meio isento de solvente, foram

testadas as seguintes razões molares: 1:5 (E1), 1:10 (E2) e 1:15 (E3) (ácido:álcool). É importante ressaltar, que a razão molar de 1:5 foi a quantidade mínima de álcool necessária para solubilizar o ácido graxo a 50 °C.

O biocatalisador selecionado para dar continuidade ao trabalho foi a lipase CAL-B imobilizada em STY-DVB-M, pois conforme observados nos experimentos realizados em modo descontínuo, foi o derivado que apresentou os melhores resultados para rendimento e produtividade.

A temperatura de 50 °C foi adotada baseada nas condições ótimas de temperatura da lipase estudado nos tópicos anteriores e conforme o trabalho Vadgma, Odaneth e Lali (2015). Os resultados estão apresentados na Tabela 13 e Figura 28.

Figura 28 - Perfil dos rendimentos obtidos na síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50°C em shaker, empregando 4% (m/v) de biocatalisador em meio isento de solvente.



Fonte: Próprio autor

Como pode ser observado não houve diferença significativa de rendimento no tempo de 240 min de reação para os 3 testes realizados, constatando-se rendimentos de 80,49% para E1, 74,90 para E2 e 79,94% em E3.

Dessa forma, selecionou-se a razão molar de 1:15 para a realização dos testes em reator de leito fixo, visto que a viscosidade do meio é mais baixa, em

função da menor concentração do ácido graxo; e portanto facilitaria a operação contínua na configuração do biorreator selecionado.

Tabela 13 - Resultados obtidos para a síntese do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50°C em shaker, empregando 4% (m/v) de biocatalisador em meio isento de solvente.

	E1 (1:5)	E2 (1:10)	E3 (1:15)
Tempo (min)	Rendimento (%)	Rendimento (%)	Rendimento (%)
0	0	0	0
15	27,45	20,73	20,21
30	31,35	27,49	30,82
45	35,7	37,83	47,59
60	49,72	38,81	55,66
90	57,11	55,12	68,17
120	59,77	62,3	74,31
180	76,1	66,92	78,53
240	80,49	74,9	79,94

Fonte: Próprio autor

Resultados similares foram observados por Vadgma, Odaneth e Lali (2015), na qual empregaram razão molar de 1:15 (ácido mirístico:álcool isopropílico) na síntese do miristato de isopropila e lipase de *Candida antarctica* imobilizada em resina acrílica (Novozym 435), obtendo rendimentos próximos de 80% em 300 min de reação.

5.3.2.2 Estudo da orientação do fluxo de alimentação no biorreator de leito fixo operado continuamente em simples estágio

Visando encontrar a melhor maneira de operar o biorreator de leito fixo, com o intuito de manter um empacotamento ideal da coluna, foram testadas alimentações ascendente e descendente do meio reacional.

As condições experimentais empregadas foram: 4,32g de biocatalisador temperatura do meio reacional de 50 °C e vazão de alimentação de 0,0405 mL/min, totalizando um tempo espacial de 5 horas. Os resultados foram comparados por meio das análises de rendimento do processo, concentração do éster e produtividade, sendo apresentados na Tabela 14 e Figura 29.

Inicialmente foi testada a alimentação ascendente, sendo empregada até 78 horas de reação, após esse período foi invertida a alimentação para descendente. Como pode ser observado, não houve diferença significativa na forma de alimentação do biorreator do leito fixo. No entanto, a operação do sistema experimental quando a alimentação foi realizada de forma descendente foi facilitada, apresentando estabilidade no leito fixo, menos pontos de vazamento e formação de bolhas no interior do biorreator.

Tabela 14 - Perfil das reações de esterificação.

	Tempo (h)	Rendimento (%)	Concentração de éster (g L⁻¹)	Produtividade (g L⁻¹ h⁻¹)
Fluxo ascendente	12	66,81	120,15	24,03
	24	62,08	126,20	25,24
	48	63,87	151,21	30,24
	72	65,24	121,74	24,35
Fluxo descendente	96	62,90	169,20	33,84
	120	66,24	103,40	20,68
	144	63,09	132,90	26,58
	168	63,13	142,30	28,46
	192	64,87	123,42	24,68
	216	60,59	123,42	24,68
	240	63,66	133,81	26,76

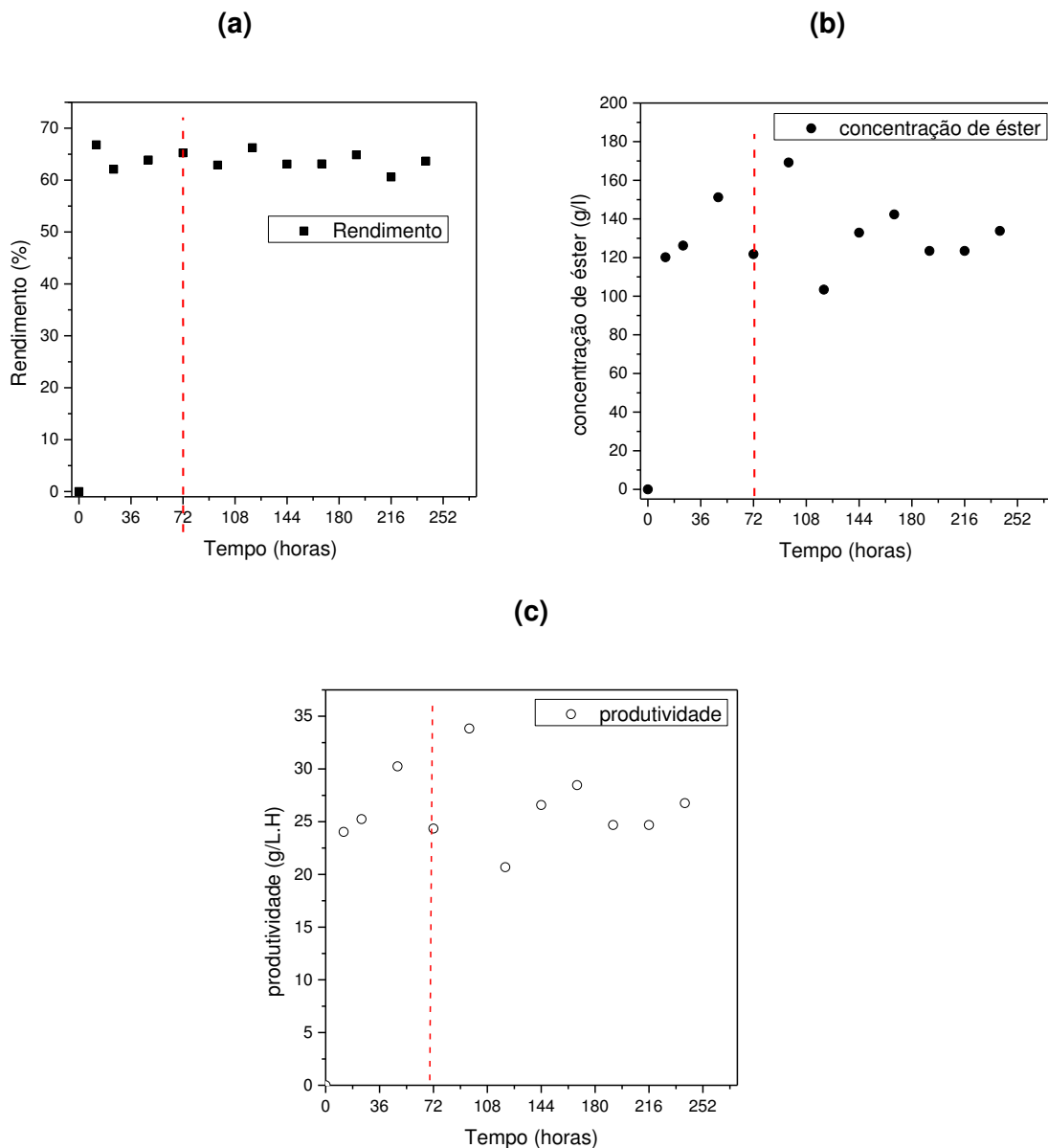
Fonte: Próprio autor

Freitas (2009), utilizando a lipase PS imobilizada em SiO₂-PVA na síntese de monoglicerídeos a partir do óleo de babaçu, verificou influência marcante da orientação do fluxo de alimentação na síntese dos emulsificantes, obtendo 5% de MAGs para o fluxo ascendente e 22% para o fluxo descendente. Segundo a própria autora, essa diferença foi explicada devido a não homogeneização do meio de alimentação no reator de leito fixo em fluxo ascendente.

Figaldo (2014) estudando a influência da orientação do fluxo de alimentação em seu trabalho que empregou a Novozym 435 na síntese de biodiesel, constatou rendimentos semelhantes (aproximadamente 90%) para ambas as orientações da alimentação.

Essas semelhanças encontradas por diferentes autores podem ser explicadas devido às baixas vazões de alimentação empregadas, o que corrobora com os resultados obtidos no presente trabalho. Dessa forma, a alimentação descendente foi selecionada para dar continuidade ao trabalho e realização dos demais testes.

Figura 29 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M, empregando fluxo de alimentação ascendente e descendente: a) Rendimento b) Concentração em éster e c) Produtividade.



Fonte: Próprio autor

5.3.2.3 Estudo da vazão de alimentação no biorreator de leito fixo operado continuamente em simples estágio

Visando elevar a produtividade do sistema avaliado, foi estudado o desempenho de duas vazões de alimentação do biorreator, sendo de 0,01 mL/min e 0,025 mL/min, resultando em tempos espaciais de 20 e 8 horas, respectivamente.

Os resultados obtidos a partir de cada vazão estão representados nas Figuras 30 e 31 e nas Tabelas 15 e 16. E as condições experimentais foi a mesma nos dois experimentos e o aparato experimental representado na imagem 30:

- Massa de biocatalisador: 4,3157 g;
- Temperatura do meio reacional: 50 °C;
- Razão Molar: 1:15 (ácido:álcool);
- Vazão de alimentação de 0,01 mL/min e 0,025mL/min;
- Tempo espacial: 8 horas e 20 horas.

Tabela 15 - Resultados obtidos para a síntese contínua do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50 °C em biorreator de leito fixo, alimentação descendente e vazão de 0,01 mL/min.

Tempo (h)	Rendimento (%)	Concentração de éster (g L ⁻¹)	Produtividade (g L ⁻¹ h ⁻¹)
12	82,88	174,57	8,73
24	84,93	169,88	8,49
48	85,86	161,21	8,06
72	84,50	185,61	9,28
96	83,50	157,49	7,87
120	90,31	166,01	8,30
144	82,47	164,55	8,23
168	86,76	165,83	8,29
192	84,28	173,84	8,69
216	86,77	173,84	8,69
240	87,60	166,03	8,30
264	86,49	181,16	9,06
288	88,73	139,60	6,98
312	86,16	188,58	9,43

Fonte: Próprio autor

Tabela 16 - Resultados obtidos para a síntese contínua do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50 °C em biorreator de leito fixo, alimentação descendente e vazão de 0,025 mL/min.

Tempo (h)	Rendimento (%)	Concentração de éster (g L⁻¹)	Produtividade (g L⁻¹ h⁻¹)
12	82,88	235,43	29,43
24	84,93	185,75	23,22
48	85,86	151,94	18,99
72	84,50	211,59	26,45
96	83,50	211,50	26,44
120	90,31	183,22	22,90
144	82,47	211,24	26,41

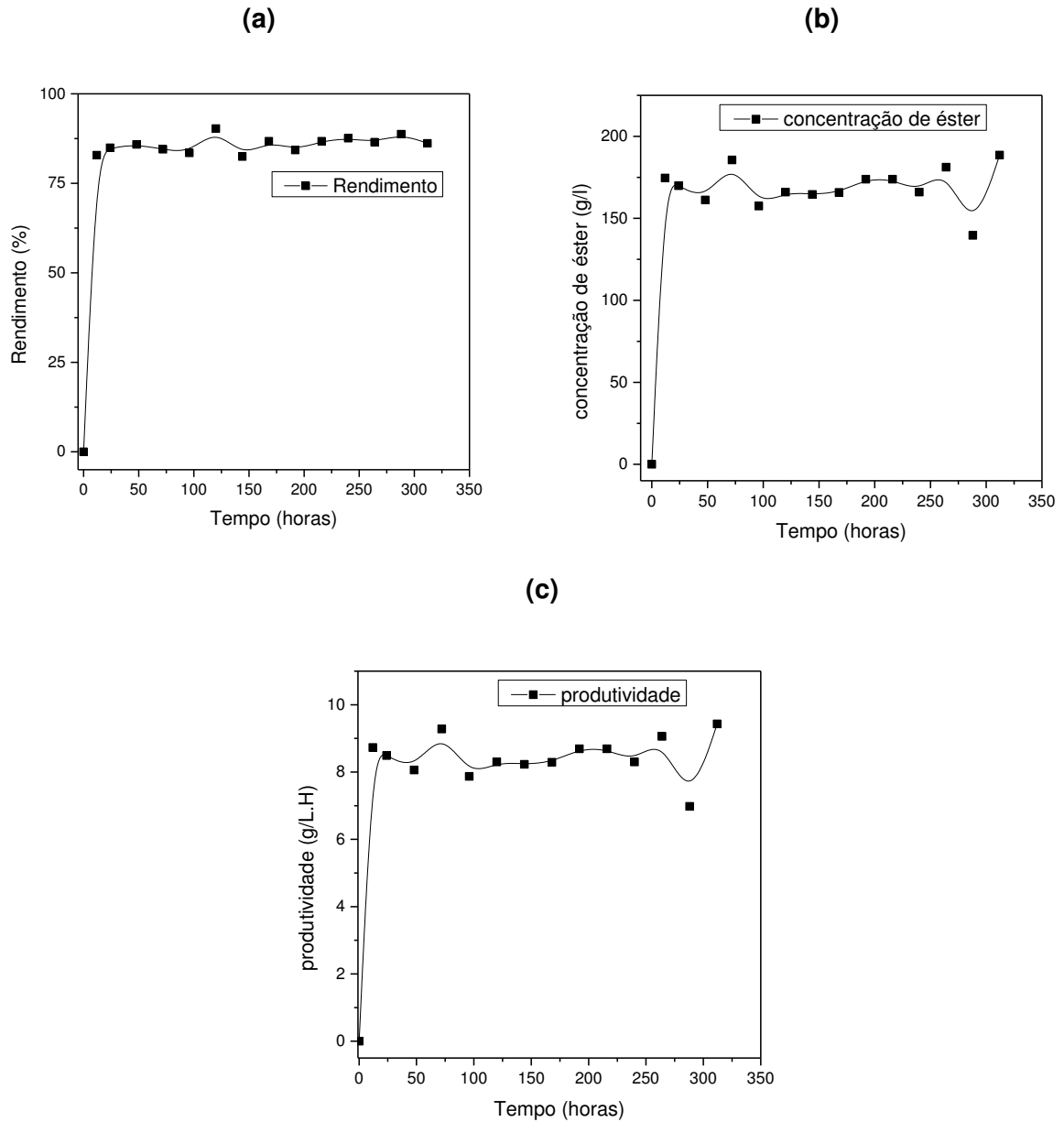
Fonte: Próprio autor

As condições experimentais foram determinadas a partir de experimentos que estão descritos nos tópicos 5.6, foi observado que em temperaturas elevadas facilita a operação do sistema, uma vez que, o substrato fica menos viscoso e não solidifica nas mangueiras.

Para algumas enzimas essa temperatura de 50 °C pode comprometer sua atividade catalítica, no entanto conforme os estudos realizados previamente e mostrado nos tópicos 5.6 demonstra que essa temperatura não compromete o poder catalítico da *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M.

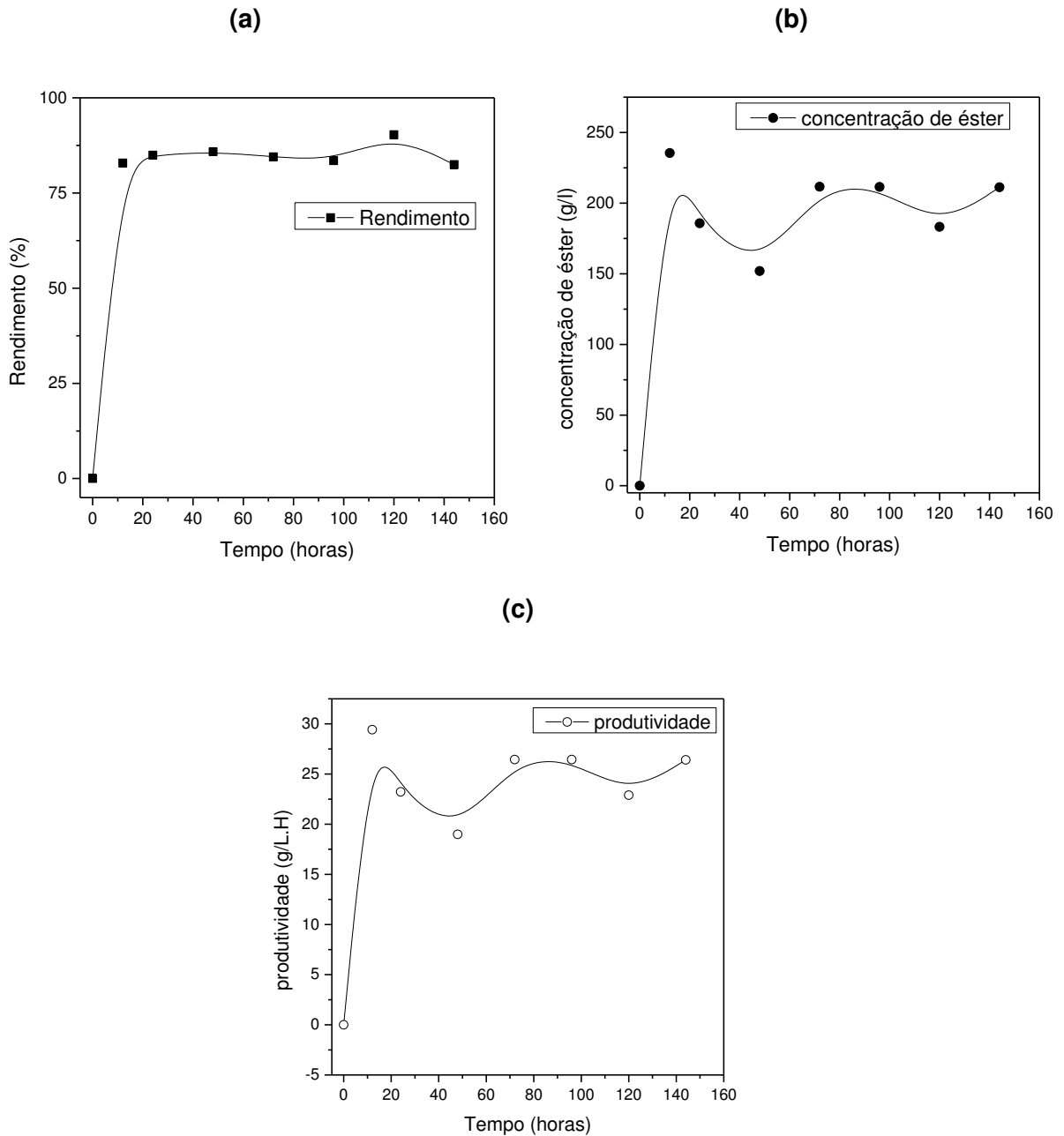
Como podemos observar nas Figuras 29 e 30, ambos os testes apresentaram estabilidade em sua operação, demonstrando rendimentos superiores a 80%. No entanto, a produtividade do éster obtida pelo sistema experimental que foi realizado com uma vazão de 0,025 mL/min, foi de aproximadamente 3 vezes maior, demonstrando que o tempo espacial de 8h é mais adequado para a realização desse bioprocessos.

Figura 30 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M, alimentação descendente e vazão de 0,01 mL/min: a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.



Fonte: Próprio autor

Figura 31 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M., alimentação descendente e vazão de 0,025 mL/min. a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.



Fonte: Próprio autor

Uma das explicações para que o tempo maior apresente uma menor produtividade é que as partículas do substrato ficam por mais tempo em contato com a enzima, e como há a formação de água durante a reação isso desloca o equilíbrio

desfavorecendo a produção de éster. Uma das possibilidades em reverter essa situação é remover a água formada durante processo.

5.3.2.4 Síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo em duplo estagio com coluna extratora de água

Visando aumentar o rendimento do processo e favorecer a produção do éster, foi avaliada a operação do sistema em duplo estágio, ou seja, foram empregados 2 biorreatores de coluna em série. Além disso, com o intuito de remover a água formada durante a reação de esterificação, e assim, deslocar o equilíbrio para a formação do éster, foi inserida uma coluna extratora, contendo peneira molecular, entre os biorreatores. Para esta finalidade, foram empregadas as seguintes condições experimentais:

- Massa total de biocatalizador utilizado nos 2 biorreatores: 8,6087 g;
- Temperatura do meio reacional: 50 °C;
- Razão Molar: 1:15 (ácido:álcool);
- Vazão 0,040 mL/min;
- Tempo espacial total: 10 horas;
- Massa da peneira molecular: 10,8g.

A massa de peneira molecular utilizada foi baseada nos estudos realizados por Freitas (2009), e que corresponde uma relação de 1:1,25 de massa do derivado imobilizado : massa de peneira molecular. A troca da coluna extratora de umidade foi realizada a cada 3 dias de operação do sistema contínuo. Os resultados obtidos estão ilustrados na Tabela 17 e na Figura 32.

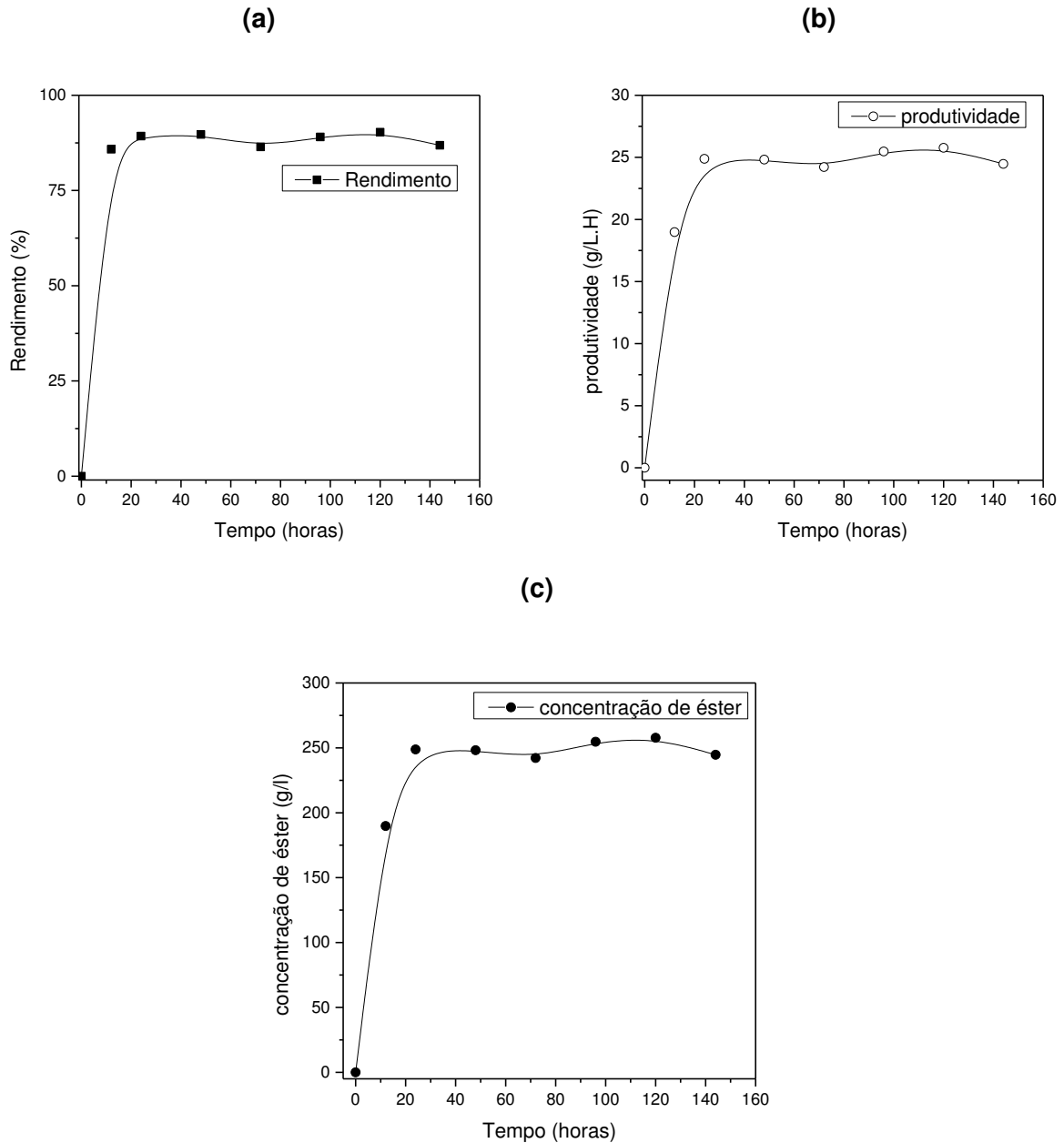
Tabela 17 - Resultados obtidos para a síntese contínua do miristato de isopropila catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M realizada a 50 °C em biorreator de leito fixo, alimentação descendente e vazão de 0,04 mL/min em duplo estágio, empregando coluna extratora de água.

Tempo (h)	Rendimento (%)	Concentração de éster (g L⁻¹)	Produtividade (g L⁻¹ h⁻¹)
12	85,83	189,77	18,98
24	89,27	248,76	24,88
48	89,70	248,22	24,82
72	86,43	242,18	24,22
96	89,06	254,66	25,47
120	90,31	257,74	25,77
144	86,86	244,68	24,47

Fonte: próprio autor

Embora não tenha sido constatada diferença significativa no rendimento do processo, foi possível notar uma estabilidade de operação maior, não sendo observada oscilações no decorrer da reação, como nos testes anteriores. Isso pode ser explicado devido a utilização da coluna extratora de água, que possibilitou a manutenção do estado estacionário do bioprocessos, devido a retirada do subproduto formado.

Figura 32 - Resultados obtidos da síntese do miristato de isopropila conduzida em biorreator de leito fixo operada continuamente e catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M, alimentação descendente e vazão de 0,04 mL/min em duplo estágio, empregando coluna extratora de água: a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.



Fonte: próprio autor

5.3.3 Síntese do miristato de isopropopila conduzida em biorreator de tanque agitado operado de modo descontínuo

Com o intuito de avaliar a síntese do miristato de isopropila em mais uma configuração de biorreator e atestar as melhores condições experimentais obtidas na realização do presente trabalho, foi realizado um experimento em um biorreator de tanque agitado, acoplado à um agitador mecânico e conduzido de modo descontínuo (Figura 33) . Os parâmetros experimentais adotados para essa síntese foram:

- A razão molar empregada foi de 1:5 (ácido: álcool);
- A reação foi conduzida em meio isento de solvente;
- A quantidade de biocatalisador empregado (lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M) foi de 4% de massa /volume;
- Temperatura de 50 °C;
- A rotação empregada no agitador mecânico foi de 300 rpm.

Figura 33 - Montagem do aparato experimental para biorreatores de batelada com agitação mecânica para síntese do miristato de isopropila da reação de 1:5 Ácido:Álcool.



Fonte: Próprio autor

Tabela 18 - Resultados obtidos para a síntese do miristato de isopropila conduzida em reator de tanque agitado.

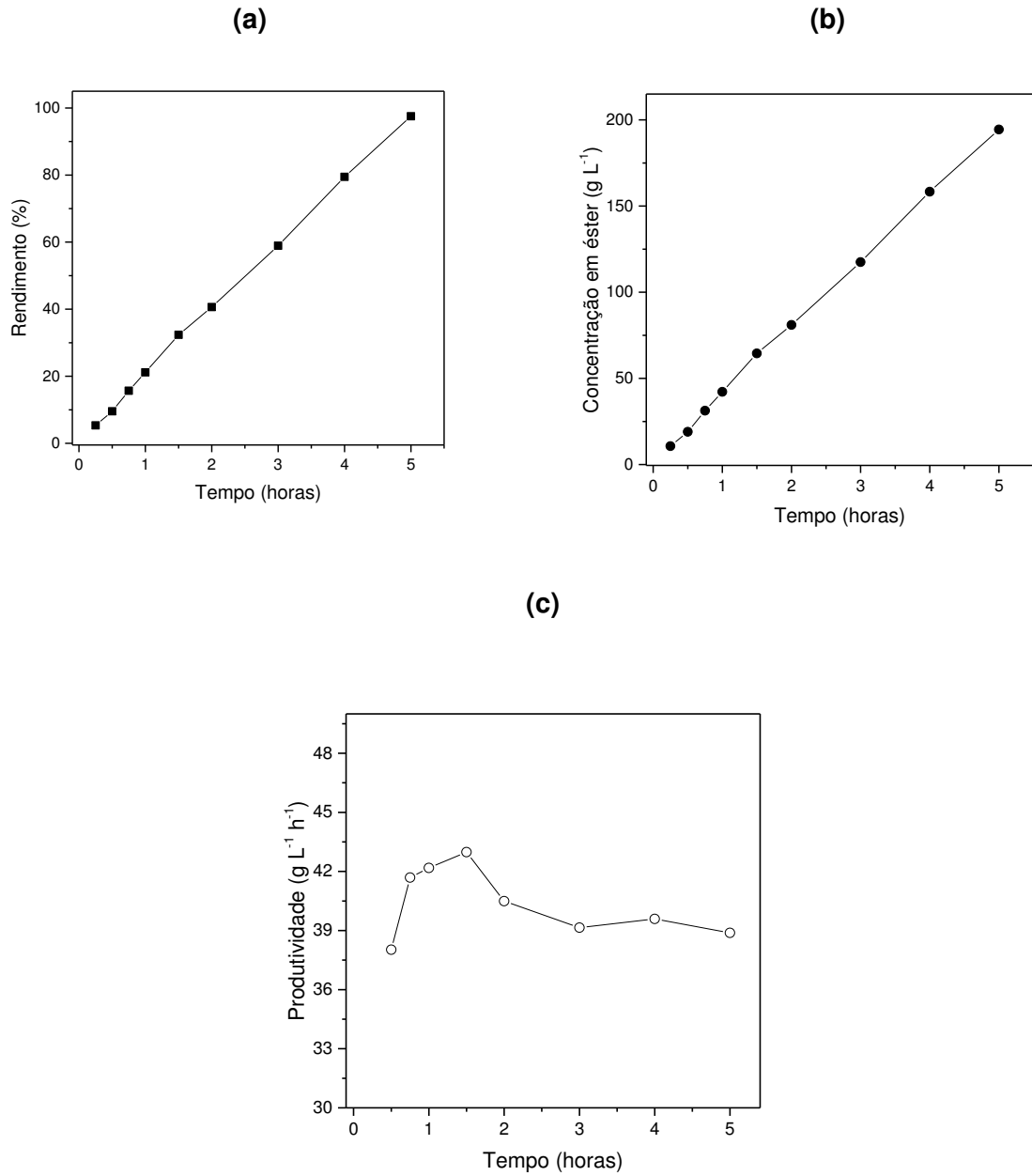
Tempo (h)	Rendimento (%)	Concentração de éster (g L⁻¹)	Produtividade (g L⁻¹ h⁻¹)
0,25	5,35	10,66	42,64
0,50	9,54	19,02	38,03
0,75	15,69	31,27	41,69
1,00	21,16	42,18	42,18
1,50	32,35	64,47	42,98
2,00	40,63	80,99	40,49
3,00	58,93	117,45	39,15
4,00	79,45	158,36	39,59
5,00	97,53	194,40	38,88

Fonte: Próprio autor

De acordo com o Tabela 18 e a Figura 34 podemos observar que a reação atingiu conversão próxima à 100% em apenas 5 horas de reação, mantendo produtividades elevadas ($\sim 40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$) diferente do observado na forma contínua, na qual o rendimento chegaram próximo de 90% e produtividade menores também ($\sim 30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

No entanto, observou-se que o biocatalisador sofre cisalhamento em função das colisões com as hélices do agitador mecânico. Esse fato é desvantajoso para a síntese do éster nesta configuração de biorreator, já que pode ocorrer perda da atividade enzimática, além da impossibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador.

Figura 34 - Resultados obtidos para a síntese do miristato de isopropila em biorreator de tanque agitado catalisada pela lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M: a) Rendimento b) Concentração e c) Produtividade.



Fonte: Próprio autor

5.4 Purificação e caracterização do miristato de isopropila

Após a obtenção do miristato de isopropila pela reação conduzida em biorretor de tanque agitado, o produto foi separado, purificado e caracterizado.

É importante conhecer alguns parâmetros do éster sintetizado, para podermos comparar com o produto comercial obtido via catálise química tradicional.

A Tabela 19 mostra os valores obtidos para densidade, viscosidade e umidade do miristato de isopropila obtido na síntese enzimática empregando a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M.

Tabela 19 - Parâmetros do miristato de isopropila obtido pela catálise da lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M.

Parâmetro	Valores
Viscosidade (mPas)	4,91
Umidade (%)	0,07
Densidade (g/cm ³)	0,83

Fonte: Próprio autor

De acordo com a ficha técnica da Fragron (2012) e da Basf (2012) o Miristato de Isopropila comercial apresenta uma viscosidade entre 5 e 6 mPas e uma densidade de 0,85 g/cm³. Sendo assim, os parâmetros calculados do éster obtido no presente trabalho estão de acordo com os parâmetros do éster comercial, indicando que o mesmo pode ser utilizado para fins comerciais.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar o miristato de isopropila, via esterificação, empregando lipases imobilizadas em STY-DVB-M, sendo avaliadas as melhores condições de síntese em diferentes configurações de biorreatores e modos de condução do bioprocessamento. Foi possível chegar as seguintes conclusões:

Síntese conduzida em frascos agitados operada em modo descontínuo: Dentre as diferentes fontes de lipases testadas (*Candida rugosa*, *Penicillium camemberti* e *Candida antarctica*), constatou-se que a lipase de *Candida antarctica* imobilizada em STY-DVB-M foi a que apresentou o melhor desempenho para a síntese do éster, visto que demonstrou elevada atividade de esterificação $1815,67 \text{ U.g}^{-1}$ e rendimentos elevados (85%), sendo selecionada para dar continuidade ao trabalho experimental;

Síntese conduzida em biorreator de leito fixo operada em modo contínuo: Foi observado que o emprego das diferentes razões molares estudadas (ácido: álcool de 1:5; 1:10; 1:15), não apresentou diferenças importantes na síntese do éster. No entanto, na razão molar de 1:15 notou-se uma maior facilidade de operação do sistema experimental, em função da menor viscosidade do meio reacional. As demais condições experimentais selecionadas como ótimas foram: alimentação descendente do fluxo reacional e tempo espacial de 8h, atingindo-se rendimentos superiores a 80%, concentração de $235,43 \text{ g L}^{-1}$ e produtividades de aproximadamente $30 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Quando empregou-se coluna extratora, como estratégia para remoção da água formada, foi observado uma maior estabilidade operacional do sistema, apresentando rendimentos na faixa de 90%, concentração em éster de 250 g L^{-1} e produtividade de $25 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$.

Síntese conduzida em tanque agitado operada em modo descontínuo: Constatou-se rendimentos próximos à 100% em apenas 5 horas de reação, concentração de $194,40 \text{ g L}^{-1}$, mantendo produtividades elevadas ($\sim 40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$). No entanto, foi observado que o biocatalisador sofre cisalhamento, em função das colisões com as hélices do agitador mecânico, o que comprometer a reutilização do mesmo.

Purificação e Caracterização do miristato de isopropila: O miristato de isopropila foi caracterizado em relação à viscosidade (4,91 mPas), densidade (0,83 g/cm³) e umidade (0,07%). Os valores obtidos para esses parâmetros são similares ao éster disponível comercialmente, indicando a possibilidade de utilização do produto sintetizado para fins comerciais.

De modo geral, as condições experimentais avaliadas para a síntese do miristato de isopropila foram bastante satisfatórias, acreditando-se que o sistema mais adequado para a síntese do éster foi o biorreator de leito fixo operado em modo contínuo, uma vez que, apresentou rendimentos, concentrações e produtividades elevadas sem ocasionar danos ao biocatalisador, tornando-o mais viável para uma possível aplicação industrial.

REFERÊNCIAS

- ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético), **Anuário 2018**. Disponível em: <<http://abihpec.org.br/anuario-2018/>>. Acesso em 20 outubro 2019.
- ABIHPEC (Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmético), **Anuário 2019**. Disponível em: <<http://abihpec.org.br/anuario-2019/>>. Acesso em 20 outubro 2019.
- AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. **Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases**, v. 159, p. 52-67, 2015.
- ALVES, J. et al. **Combined Effects of Ultrasound and Immobilization Protocol on Butyl Acetate Synthesis Catalyzed by CALB**. *Molecules*, [s.l.], v. 19, n. 7, p.9562-9576, 7 jul. 2014. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules19079562>.
- AMINI, Z. et al. **State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production**. *Energ. Convers. Manage.*, v. 141, p. 339-353, 2017.
- BASF. **Ficha de dados de segurança**. São Paulo: Fagron, 2012. Disponível em: <http://www.royalmarck.com.br/upl/produto/47e10b7e13.pdf>. Acesso em: 06 jun. 2020.
- BENTO, H. B. S. et al. **Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation**. *J. Magn. Magn. Mater.*, 426, 95-101, 2017.
- BENTO, H. B. S. **Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)**. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade de São Paulo, EEL-USP, Lorena. 2015.
- BIANCHI, CARLOS. **A Indústria Brasileira de Biotecnologia: montando o quebra-cabeça**. Curitiba: Revista Economia & Tecnologia (ret), 2011. 18 p. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/ret/article/viewFile/30907/20977>>. Acesso em: 11 jul. 2018.
- Brasil - **NATURA DIZ QUE CUSTO DE UNIÃO DE NEGÓCIOS COM AVON SERÁ DE R\$ 349 MI-** <https://economia.estadao.com.br/noticias/geral,natura-diz-que-custo-de-uniao-de-negocios-com-avon-sera-de-r-349-mi,70003047736>. **Acesso em:** 20/10/2019.
- BUCHHOLZ, K.; KASCHE, V.; BORNSCHEUER, U. T. **Biocatalysts and Enzyme Technology**, 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. 626 p, 2012.
- BUGG, T. D. H. **Introduction to enzyme coenzyme chemistry**, 3th ed. New York: Wiley, 2012. 290 p, 2013.
- CASTIGLION, G. L. et al. **Application of Poly(styrene-co-divinylbenzene) microporous microparticles as a catalyst in the enzymatic synthesis of biodiesel**. *J. Polym. Enviro*, 2016.

CHANG, S.F.; CHANG, S.W.; YEN, Y.H. e SHIEH, C.J. **Optimum immobilization of candida rugosa lipase on celete**. Applied Clay Science v.37, pa 67-73, 2007.

CHOI, J., HAN, S., KIM, H. **Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects**. Biotechnol. Adv., v. 33, p. 1443-1454, 2015.

CRUZ JÚNIOR, A., **Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**. 2007. 122 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. **Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros**. Química Nova, v. 27, n.4, p. 623-630, 2004.

DAMSTRUP, M. L. et al. Process development of continuous glycerolysis in an immobilized enzyme-packed reactor for industrial monoacylglycerol production. **J. Agric. Food Chem.**, v. 55, p. 7786-7792 2007.

DE CASTRO, H. F. et al. **Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício**. In: BIOCATALISE e biotransformação: fundamentos e aplicações. São Paulo: Schoba, 2010, v.1. p.275-337.

DE CASTRO, H. F.; MENDES, A. A.; FREITAS, L.; SANTOS, J. C. **Modificação enzimática de óleos e gorduras para a obtenção de biocombustíveis e produtos de interesse do setor alimentício** In: Biotatalise e Biotransformação – Fundamentos e Aplicações. 1 ed. São Paulo: Schoba, 2010, v.1, p.275-337.

DE CASTRO, H. F.;BRUNO, L. M.; LIMA FILHO, J. L.; **Comparative performance of microbial lipases immobilized on magnetic polysiloxane polyvinyl alcohol particles**. Braz. Arch. Biol. Techn., v.51, n.5, p889-896, 2008.

DIZGE, N.; KESKINLER, B.; TANRISEVEN, A. **Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer**. Biochem. Eng. J., v 44, p. 220-225, 2009.

DUSSÁN, K. J.; CARDONA, C. A.; GIRALDO, O. Immobilization and characterization of the *Candida rugosa* lipase enzyme on magnetic particles. **Rev. Mex. Fís.**, v. 58, p.47-51, 2012.

DWEVEDI, A. **Enzyme immobilization: advances in industry, agriculture, medicine, and the environment**. Basel: Springer, 132 p, 2016.

FAGRON IBERICA. **Ficha de dados de segurança**. São Paulo: Fagron, 2012. Disponível em: https://fagron.com/sites/default/files/document/msds_coa/110-27-0_%28PT%29.pdf. Acesso em: 06 jun. 2020.

FERREIRA J. F.; PADILHA, G. S.; CASTIGLIONI, G. L.; ALEGRE, R. M.; TAMBOURGI, E. B. **Avaliação da lipase extracelular *Pseudomonas cepacia* para purificação em sistema bifásico aquoso**. Ciênc. e Tec. de Ali, p. 16-22, 2011.

FIDALGO, W. R. R. **Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais**. 2014. 158. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena. 2014.

FREITAS, L. et al. **Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor**. Eur. Food Res. Technol., v. 233, p. 743-750, 2011.

FREITAS, L. et al. **Strategies to remove water formed as by-product on the monoolein synthesis by enzymatic esterification performed on packed bed reactor**. Eur. Food Res. Technol., v. 233, p. 743-750, 2011.

GARCIA-DIEGO, C.; CUELLAR J. **Synthesis of Macroporous Poly (styrene-co-divinylbenzene) Microparticles Using n-Heptane as the Porogen: Quantitative Effects of the DVB Concentration and the Monomeric Fraction on Their Structural Characteristics**. Ind. Eng. Chem. Res., n. 44, p. 8237-8247, 2005.

GORCEA, M.; LAURA, D. **Evaluating the physicochemical properties of emollient esters for cosmetic use**. International Specialty Products (ISP), v. 31, 2013.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**, 3th ed. Totowa: Humana Press, 464 p. 2013.

GOTOR-FERNANDÉZ, V. et al., **Candida antarctica Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds**. 33p. 2006.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. **Industrial applications of microbial lipases**. Enzyme and Microbial Technology, v. 39, p. 235-251, 2006.

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

LEE, Y.; RHO, J.; JUNG, B. **Preparation of Magnetic Ion-Exchange Resins by the Suspension Polymerization of Styrene with Magnetite**. Journal of Applied Polymer Science, v. 89, p. 2058-2067, 2003.

LIMA, W. A. **Síntese e caracterização de compósitos polianilina/poli(estireno-co-divinilbenzeno) para Adsorção de Ânions [SnCl₄]²⁻**. 2013. 120p. Dissertação (mestrado) - Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás – IQ/UFG, Goiânia. 2013.

MESSIAS, Josana Maria et al. **Lipases microbianas: Produção, propriedades e aplicações biotecnológicas**. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, [s.l.], v. 32, n. 2, p.213-234, 30 set. 2011. Universidade Estadual de Londrina. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0375.2011v32n2p213>.

NAJAFPOUR, G. D. Bioreactor Design. In: **BIOCHEMICAL engineering and biotechnology**. Netherlands: Elsevier, Cap 6, p.142-169, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**, 6th ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 5th ed, 2011, 1273 p, 2011.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. **Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes**. J. Mol. Catal. B: Enzym. v. 85-86, p. 71–92, 2013.

NISHAT, R. K.; VIRENDRA, K. R. **Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: a review**. Process Biochem., v. 50, p. 1793-1806, 2015.

OLIVEIRA, P. C.; ALVES, G. M.; DE CASTRO, H. F. **Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene divinylbenzene copolymer**. Biochemical Engineering Journal, v.5, p.63-71, 2000.

PEREIRA JR, N. **Tecnologia de bioprocessos**. Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.

PESSÔA, M.G. et al. **Newly isolated microorganisms with potential application in biotechnology**. Biotechnol. Adv., v. 37, p. 319-339, 2019.

PINTO, M. C.; FREIRE, D. M. G.; PINTO, J. C. **Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica***. Molecules, v. 19, p. 12509-12530, 2014.

POPPE, J. K. et al. **Síntese de biodiesel catalisada por lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em esferas de estireno divinil-benzeno**. Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática, 2015.

POPPE, J. K. et al. **Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects**. Biotechnol. Adv., v. 33, p. 511-525, 2014.

RAJESHKUMAR, N. V.; ANNAMMA, A. O., ARVIND, M. L. **Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part II: Packed bed reactor (PBR) studies**. Biotechnol. rep., v. 8, p. 105-109, 2015.

RAMOS, L. ; Teixeira, Larissa F. ; Oliveira, P.C. ; DE CASTRO, H.F. . **Influência da relação geométrica do reator de leito fixo na produção contínua de biodiesel enzimático em meio isento de solvente**. In: XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014, Florianópolis. COBEQ 2014, 2014.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleo vegetal catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. 2009. 183 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas como agentes biotecnológicos**, 2ª ed. Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014.

SALIHU, A; ALAM, M. Z. **Solvent tolerant lipases: a review**. Process Biochem., v. 50, p. 86-96, 2015.

SANTO, J. C. et al. **Lipase-catalyzed synthesis of butyl ester by direct esterification on solvent-free system.** J. Chem. Technol. Viot., V.82, p. 956-961, 2017.

SILVA, J. A., **PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES UTILIZANDO LIPASE DE *Candida antarctica* TIPO B IMOBILIZADA PARA A SÍNTESE DE ÉSTERES DE VITAMINA A.** 2007. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2007.

SILVA, M. V. C. **Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado.** 2017. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

SILVA, M. V. C. ; SOUZA, C. A. P. ; OLIVEIRA, P.C. ; DE CASTRO, H.F. ; FREITAS, L. . **Isopropyl myristate continuous synthesis in a packed-bed reactor using lipase immobilized on magnetic polymer matrix.** INTERNATIONAL JOURNAL OF ENGINEERING RESEARCH & SCIENCE, v. 4, p. 12-20, 2018.

STERGIOU, P. Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotech. Advances**, v. 31, p. 1846-1859, 2013.

SZELWICKA, et Al. **Carbon nanotube/PTFE as a hybrid platform for lipase-assisted transformation of α -angelica lactone to alkyl levulinates,** 30p, 2020.

TANASKOVIĆ, S. J. et al. **Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants.** Appl. Clay Sci., v. 135, p. 103-111, 2017.

TREVISAN, H. C. Lipases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes Biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, Cap.7. p. 337-357, 2014.

VADGMA, R. N.; ODANETH, A. A.; LALI. **Green synthesis of isopropyl myristate in novel single phase medium Part I: batch optimization studies.** Biotechnol. Rep., v. 8, p. 133-137, 2015.

VERMA, M. L.; BARROW, C. J.; PURI, M. **Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production.** Appl. Microbiol. Biot., v.97, p.23-39, 2013.

VILAS BÔAS, R. N. **Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas.** 2018. 183 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena/ SP, 2018.

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas imobilizadas. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. **Enzimas como agentes biotecnológicos.** Ribeirão Preto: Legis Summa, 2014. Cap.4. p.41-84.