

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

JOSÉ GERALDO ESTEVES GUEDES JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DIÉSTERES DE
ETILENO GLICOL (BIOLUBRIFICANTES) POR HIDROESTERIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE FRITURA**

**BELO HORIZONTE - MG
2021**

JOSÉ GERALDO ESTEVES GUEDES JUNIOR

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DIÉSTERES DE
ETILENO GLICOL (BIOLUBRIFICANTES) POR HIDROESTERIFICAÇÃO
ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE FRITURA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Química.

Linha de Pesquisa: Tecnologias limpas, materiais e nanotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes

BELO HORIZONTE – MG
2021

Guedes Junior, José Geraldo Esteves.

G924d

Desenvolvimento e otimização da produção de diésteres de etileno glicol (biolubrificantes) por hidroesterificação enzimática do óleo de fritura [recurso eletrônico] / José Geraldo Esteves Guedes Junior. - 2021.

1 recurso online (103 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Adriano Aguiar Mendes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Engenharia.

Inclui bibliografia.

Exigências do sistema: Adobe Acrobat Reader.

1. Engenharia química - Teses. 2. Biolubrificantes - Teses. 3. Lipase - Teses. 4. Otimização - Teses. I. Mendes, Adriano Aguiar. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 66.0(043)

Ficha catalográfica elaborada pelo bibliotecário Reginaldo Cesar Vital dos Santos CRB6/ 2165

Biblioteca Prof. Mário Werneck, Escola de Engenharia da UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

FOLHA DE APROVAÇÃO

“DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE DIÉSTERES DE ETILENO GLICOL (BIOLUBRIFICANTES) POR HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DO ÓLEO DE FRITURA”

José Geraldo Esteves Guedes Junior

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como partedos requisitos à obtenção do título de **MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA**.

288ª DISSERTAÇÃO APROVADA EM 29 DE OUTUBRO DE 2021 POR:



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Fernandes Vieira, Usuário Externo**, em 29/10/2021, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Silva Franca, Professora do Magistério Superior**, em 29/10/2021, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriano Aguiar Mendes, Usuário Externo**, em 29/10/2021, às 16:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1027995** eo código CRC **FE618939**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus. Ele foi quem permitiu que eu trilhasse esse caminho e me deu forças para que eu não desistisse do mesmo.

Posteriormente, aos meus pais, José e Sonia, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em minhas decisões e fazendo o impossível para que eu realizasse tudo o que eu desejasse.

Aos meus irmãos, Sarah e Edilberto, que apesar das brigas sempre foram base e força nos momentos de necessidade.

Aos meus amigos, os quais não irei citar nomes para não causar discórdia, que estiveram comigo nos momentos de lamentações e nos quais a vontade de desistir foi enorme. Obrigado por me ajudarem a perseverar em meus objetivos e por serem minha fortaleza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano Aguiar Mendes que tornou todo esse trabalho possível, sempre me motivando a crescer como pessoa e como pesquisador, e me tirando da minha zona de conforto para, dessa maneira, evoluir constantemente.

À Profa. Dra. Érika Cristina Crén, não só pela parceria com esse trabalho, mas também pela trajetória que trilhamos desde a graduação até o estágio docência.

Aos professores do Departamento de Engenharia Química da UFMG, que permitiram juntamente com a instituição, que eu me tornasse primeiramente Bacharel em Engenharia Química e atualmente almejando esse título de Mestre. Agradeço em especial às Profas. Dra. Kátia Figueiredo, Dra. Andrea Oliveira e Dra. Vanessa Lins que estiveram comigo desde a graduação até este momento.

À Universidade Federal de Minas Gerais e à Universidade Federal de Alfenas pela infraestrutura e pelo apoio concedidos a nós, alunos de pós-graduação. Em especial gostaria de agradecer ao pessoal do Laboratório de Bioprocessos da UNIFAL pelo auxílio e acolhimento.

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa (Processo 130015/2020-2). Agradeço também ao CNPq (Processo 404929/2016-8) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (Processo APQ-02196-15) pelo suporte financeiro.

Dedico essa dissertação a Deus, aos meus pais, amigos e familiares. Sem cada um de vocês eu não seria nada e nada disso seria possível. Obrigado por estarem sempre comigo, comemorando e sofrendo juntos.

“E não sede conformados com este mundo, mas sede transformados pela renovação do vosso entendimento, para que experimenteis qual seja a boa, agradável e perfeita vontade de Deus.” Romanos 12:2

RESUMO

O objetivo do presente projeto de mestrado foi a produção um biocatalisador enzimático capaz de sintetizar diésteres com propriedades lubrificantes (biolubrificantes) pela hidroesterificação do óleo de fritura. A primeira etapa deste processo consistiu na sequencial produção de ácidos graxos livres (AGL) por hidrólise enzimática do óleo de fritura catalisada pelo extrato enzimático bruto de lipase de *Candida rugosa* (LCR). Completa hidrólise do óleo foi obtida em 3 h de reação empregando razão mássica óleo:água de 40% m/m, 45°C, agitação mecânica de 1500 rpm e concentração de lipase de 3,2 g/L. Em seguida, os AGL obtidos foram separados do meio de reação, lavados com água destilada e desidratados para serem empregados como matéria-prima na segunda etapa do processo (esterificação). As reações de produção dos diésteres por esterificação foram realizadas em sistemas ambientalmente corretos (isentos de solventes orgânicos). Nesta etapa, uma preparação de lipase de *Thermomyces lanuginosus* (Eversa® Transform 2.0) imobilizada em partículas de poli(estireno-divinilbenzeno) foi empregada como biocatalisador heterogêneo. A lipase foi imobilizada via adsorção física (mecanismo de ativação interfacial) no suporte hidrofóbico empregado em tampão acetato de sódio pH 5,0 com baixa força iônica (5 mM), por 18 h de contato a 25°C e em agitação mecânica em banho termostatizado (200 rpm) e a carga enzimática inicialmente oferecida foi de 40 mg/g de suporte. Elevada concentração de proteína imobilizada da ordem de 36 mg/g (que corresponde a um rendimento de imobilização da ordem de 90%) foi obtido devido à alta área superficial e diâmetro de poros do suporte que permite imobilizar alta concentração de lipase. Após a preparação do biocatalisador heterogêneo, foi avaliada a influência do tipo de glicol na sua atividade catalítica. Neste estudo, foram empregados quatro tipos de glicóis como dietileno glicol (DEG), propileno glicol (PG), neopentil glicol (NPG) e o etileno glicol (EG). Máxima conversão dos AGL de 87% após 90 min de reação foi observada para o EG, então selecionado para estudos de otimização. O efeito de parâmetros relevantes na produção dos ésteres como temperatura de reação, concentração de biocatalisador e razão molar EG:AGL foi avaliado por um delineamento central composto rotacional (DCCR). Nas condições ótimas de reação, foi avaliado o efeito do tempo para alcançar a máxima conversão da reação. De acordo com os resultados obtidos, a conversão total dos grupos hidroxila do EG foi alcançada em 40 min de reação a 65°C empregando razão molar EG:AGL de 1:3 e 18% m/m do biocatalisador heterogêneo preparado. Nas mesmas condições, o extrato da lipase solúvel proporcionou uma conversão máxima de apenas 32,5%. Esses resultados mostram claramente que o biocatalisador preparado é altamente ativo na produção de ésteres industriais (biolubrificantes) e que a imobilização é de extrema importância, visto que aumenta a atividade catalítica e permite a reutilização da enzima. Testes de reuso foram realizados a fim de analisar a estabilidade do biocatalisador preparado após sucessivas bateladas de esterificação. Após sete ciclos sucessivos de esterificação, máxima conversão dos ácidos foi de 37%. A produção de diésteres foi confirmada por ressonância magnética nuclear de próton (¹H RMN). As propriedades físicas dos diésteres de EG produzidos

como viscosidade cinemática, índice de viscosidade, e ponto de fluidez foram determinadas por metodologias padrões. Com base nos resultados obtidos, a viscosidade cinemática a 40°C e 100°C dos diésteres preparados foi respectivamente de $27,3 \pm 1,6$ e $5,7 \pm 0,4$ mm²/s. O índice de viscosidade determinado foi de $166,2 \pm 18,2$. Os diésteres produzidos apresentam bom desempenho em baixas temperaturas, pois o seu ponto de fluidez foi de -9 ± 2 °C. Suas propriedades físicas foram similares aos diésteres de EG obtidos a partir do óleo de soja descritos na literatura e com lubrificantes comerciais fornecidos pela Emery Oleochemicals (Dehylube® 4016 e Dehylube® 4016 US) e Zschimmer & Schwarz (LEXOLUBE 3JN-310 e LUBRICIT NGDO). Estes resultados mostram que o processo proposto pode ser uma alternativa interessante do ponto de vista industrial devido à alta atividade catalítica do biocatalisador em condições brandas de reação. Além disso, as propriedades físicas dos diésteres produzidos a partir de uma matéria-prima de baixo custo obtida no processamento de alimentos foram similares aos biolubrificantes disponíveis comercialmente.

Palavras-chave: Biolubrificantes, Óleo de fritura, Hidroesterificação, Lipase imobilizada, Otimização.

ABSTRACT

The aim of this Dissertation (Master of Science) has been the production of an enzymatic biocatalyst capable of synthesizing diesters with lubricant properties (biolubricants) through hydroesterification of used soybean cooking oil – USCO (or waste cooking oil). The first step consisted in FFA production via enzymatic hydrolysis of USCO catalyzed by a crude lipase extract from *Candida rugosa* (CRL). Complete hydrolysis of the oils were achieved after 3 h of reaction at 40 °C, using 3.2 g/L of CRL, mechanical stirring frequency of 1500 rpm and oil:water mass ratio of 40% m/m. Next, the produced FFA have been separated, washed with distilled water and dehydrated to be used as starting materials in esterification step. In this study, the esters production has been performed in an eco-friendly process (solvent-free systems) and open reactors to eliminate formed water molecules in the reaction. In this step, a liquid lipase preparation from *Thermomyces lanuginosus* (Eversa® Transform 2.0) has been immobilized on poly(styrene-divinylbenzene) particles and it has been used as heterogeneous biocatalyst. The immobilization protocol proceeded by physical adsorption via mechanism of interfacial activation at low ionic strength (5 mM) buffer sodium acetate pH 5.0 at 25°C, 18 h of contact under continuous mechanical stirring (200 rpm) in a controlled water bath temperature using an initial protein loading of 40 mg protein/g of support. High protein loaded biocatalyst around of 36 mg/g (immobilization of ≈90%) has been obtained due to high surface area and pore size of the support. In this study, four different glycols such as ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), diethylene glycol (DEG) and neopentyl glycol (NPG) were used as reactants in diesters production via esterification of the produce FFA using immobilized Eversa® Transform 2.0 as heterogeneous biocatalyst. Maximum OH conversion of 87% at 90 min of reaction was achieved using EG. Thus, further tests for optimizing the enzymatic esters production using statistical tools were performed with EG. The effect of three relevant parameters such as heterogeneous biocatalyst concentration, reaction temperature and EG:FFA molar ratio was evaluated using a full factorial design in a CCRD mode. Under optimal experimental conditions, the effect of contact time on the esters production has also been evaluated. According to results, full OH conversion was achieved at 65 °C, EG:FFA molar ratio of 1:3, and biocatalyst concentration of 18% m/m at 40 min of reaction. Maximum OH conversion of only 32.5% was obtained using crude lipase extract under such conditions. The biocatalyst retained ≈37% of its original activity after seven successive esterification batches. The diesters production has been confirmed by proton nuclear magnetic resonance analysis (¹H NMR). The physical properties of the produced diesters such as kinematic viscosity, viscosity index and pour point have been determined according to standard methods. Based on these results, kinematic viscosity values at 40°C and 100°C were 27.3 ± 1.6 e 5.7 ± 0.4 mm²/s. In addition, the viscosity index was of 166.2 ± 18.2 . They presented good cold temperature properties, since its pour point was -9 ± 2 °C. The physical properties of the produced diesters were comparable with EG diesters from soybean oils described in literature and commercial synthetic esters from two companies: Emery Oleochemicals (Dehylube® 4016 and Dehylube®4016 US) and

Zschimmer & Schwarz (LEXOLUBE 3JN-310 and LUBRICIT NGDO). These results clearly show that the proposed process can be an interesting option in industrial processes due to its high catalytic activity under mild reaction conditions (65 °C and atmosphere pressure). Moreover, the physical properties of the produced diesters using a low-cost oleaginous feedstock, a waste oil from the food processing, were similar to commercial synthetic esters.

Keywords: Biolubricants, Used soybean cooking oil, Hydroesterification, Immobilized lipase, Optimization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Produção mundial de lubrificantes em 2019 segmentada pelos países produtores.....	211
Figura 2- Estrutura química dos ácidos graxos componentes do óleo de soja.....	24
Figura 3- Diferentes reações catalisadas por lipases.....	29
Figura 4- Protocolos de imobilização de Lipases.....	31
Figura 5- Lipase imobilizada via ativação interfacial em superfície hidrofóbica.....	34
Figura 6- Representação esquemática da reação de copolimerização de estireno com divinilbenzeno.....	36
Figura 7- Estrutura química do etileno glicol.....	37

CAPÍTULO 1

Figure 1- Representative scheme of the enzymatic production of the different glycol esters via esterification.	65
Figure 2- Effect of reaction time on the esterification of different glycols with FFA from USCO in solvent-free systems catalyzed by Eversa® Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB beads. The reactions were performed using a stoichiometric glycol:FFA molar ratio (1:2), 40°C, 240 rpm and biocatalyst concentration of 10% m/m.	66
Figure 3- 3D response surfaces for enzymatic production of EG diesters. Effect of biocatalyst concentration and EG:FFA molar ratio (A), and effect of reaction temperature and EG:FFA molar ratio (B) on the OH conversion percentage.....	71
Figure 4- Effect of reaction time on the enzymatic production of EG esters (A) and operational stability tests (B) under optimal experimental conditions (EG:FFA molar ratio of 1:3, 65 °C, 240 rpm and biocatalyst concentration of 18% m/m).	77
Figure 5- 1H NMR spectra of EG diesters production at different reaction times.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Comparação entre a catálise homogênea e heterogênea.	28
Tabela 2- Reações catalisadas por lipases para produção de biolubrificantes.	30
Tabela 3- Vantagens e Desvantagens da porosidade na imobilização.	36
Tabela 4- Estudos utilizando etileno glicol para produção de biolubrificantes.	38

CAPÍTULO 1

Table 1- CCRD matrix for the analysis of the effect of independents variables on the enzymatic production of EG esters.	68
Table 2- Regression coefficients, standard errors and p-values and analysis of variance (ANOVA) for the proposed model of enzymatic production of EG esters. ...	69
Table 3- Validation of the developed CCRD by performing enzymatic production of EG esters under optimal experimental conditions.	73
Table 4- Physical properties of the produced EG esters and comparison with other lubricant esters.	82
Table 5- Bibliographic survey for EG esters production using several catalysts and oleaginous feedstocks.	85

LISTA DE ABREVIÇÕES

AGL – Ácidos graxos livres.

BSA – Albumina sérica bovina

DCCR- Delineamento central composto rotacional

DEG - Dietileno glicol

EG - Etileno glicol

LCR – Lipase de cândida rugosa

NPG - Neopentilglicol

PG - Propileno glicol

PSty-DVB - Poli(estireno-divinilbenzeno)

TLL- Thermomyces lanuginosus.

APRESENTAÇÃO

O trabalho desenvolvido durante o mestrado aborda a produção e caracterização de biocatalisadores heterogêneos preparados por imobilização de lipase via adsorção física em suporte hidrofóbico comercial – partículas de poli(estireno-divinilbenzeno), a fim de aplicá-los na síntese de biolubrificantes por hidroesterificação de óleo de cozinha com etileno glicol. O texto apresentado nesse documento está dividido em três principais partes, além da conclusão e sugestões para trabalhos futuros.

Na introdução desse trabalho, são reportadas a motivação e a proposta do projeto, especificando o preparo de biocatalisadores heterogêneos a partir da imobilização por adsorção física de lipases, assim como sua aplicação na síntese de um éster com propriedades biolubrificantes, além dos objetivos gerais e específicos do trabalho desenvolvido.

A segunda parte aborda uma revisão bibliográfica para o desenvolvimento do trabalho através de conceitos como biolubrificantes, óleos residuais, modificações químicas de óleos, tipos de catálise, lipases, métodos de imobilização enzimática e tipos de suportes. Essa revisão justifica a escolha desse tema, bem como trás todo o embasamento teórico necessário para o andamento e posteriores conclusões dessa dissertação.

A terceira parte consiste na compilação da metodologia e resultados obtidos no decorrer do projeto em um artigo submetido para publicação em periódico indexado.

São também apresentadas a conclusão e algumas sugestões e recomendações para trabalhos futuros.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 LUBRIFICANTES	21
2.2 BIOLUBRIFICANTES	22
2.2.1 ÓLEOS VEGETAIS.....	23
2.2.1.1 OLEO DE SOJA.....	23
2.2.1.2 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DOS OLEOS VEGETAIS.....	24
2.2.1.3 VANTAGENS E DESVANTAGENS DOS ÓLEOS VEGETAIS.....	25
2.2.2 ÓLEOS RESIDUAIS	25
2.3 CATALISADORES PARA A FABRICAÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES.....	27
2.3.1 CATÁLISE QUÍMICA: HOMOGÊNEA X HETEROGÊNEA	27
2.3.2 CATÁLISE ENZIMÁTICA: LIPASES	28
2.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR DIFERENTES PROTOCOLOS.....	31
2.4.1 PROTOCOLOS DE IMOBILIZAÇÃO	31
2.4.2 SUPORTES.....	34
2.4.3 POLI (ESTIRENO-DIVILBENZENO).....	36
2.5 ALCOOIS PARA A SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTES.....	37
2.5.1 ETILENO GLICOL	37
2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
3. ARTIGO: DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF A SUSTAINABLE PROCESS FOR ENZYMATIC PRODUCTION OF ETHYLENE GLYCOL DIESTERS FROM USED SOYBEAN COOKING OIL	51
4. CONCLUSÃO GERAL	99
5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	101

1. INTRODUÇÃO

Nos dias atuais, a sustentabilidade deixou de ser um tabu e algo fora da realidade, passando a ser mandatória nos processos produtivos. A extinção de recursos, os grandes desperdícios e a intensa poluição foram os grandes responsáveis por tal mudança. Com as atuais reservas de petróleo no mundo e o corrente consumo, vislumbra-se a exaustão do mesmo e uma instabilidade em seu abastecimento (YOSHIDA *et al.*, 2021). Além disso, a mudança climática decorrente das emissões dos gases de efeito estufa aponta uma crise ambiental gerada por mudanças na temperatura e nas precipitações (CHEN *et al.*, 2021). Esses motivos levaram os diversos setores industriais a buscarem alternativas ao petróleo e seus derivados.

No setor de lubrificantes, compostos utilizados para reduzir o atrito entre superfícies móveis pela formação de uma película protetora (HO *et al.*, 2019), a dependência de insumos de origem fóssil bem como o descarte incorreto desses materiais fica muito evidente. Cerca de 50% de todo lubrificante utilizado no mundo contribui para a poluição do ambiente pela perda de funcionalidade, derramamentos ou volatilização (RIOS *et al.*, 2020). Com o intuito de contribuir com o controle da poluição e na preservação ambiental, surgem produtos ecologicamente corretos, em destaque os biolubrificantes, como alternativa promissora aos lubrificantes clássicos provenientes do petróleo (BASSI *et al.*, 2016; CECILIA *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020a).

Os biolubrificantes são óleos, naturais ou sintéticos, que possuem bom desempenho de lubrificação, alto índice de viscosidade e boa lubrificação a frio (CHAN *et al.*, 2018). Entre eles destacam-se os óleos vegetais, as gorduras animais, óleos microbianos e óleos residuais (MCNUTT E HE, 2016; ZAINAL *et al.*, 2018; HO *et al.*, 2019; ALVES *et al.*, 2017) bem como ésteres sintéticos e polialfaolefinas (REEVES *et al.*, 2017). Entretanto, a aplicação direta de óleos e gorduras apresenta algumas limitações como baixa estabilidade termo-oxidativa e sua alta viscosidade (DA SILVA *et al.*, 2015; SYAHIR *et al.*, 2017). Com o intuito de superar estas limitações, algumas estratégias têm sido propostas como, por exemplo, modificações químicas dos mesmos (KARMAKAR *et al.*, 2017; REEVES *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2018;

KUMAR E PAL, 2021). Entre as rotas de modificação química de óleos destacam-se a esterificação, transesterificação, hidroesterificação e epoxidação empregando catalisadores químicos clássicos e enzimas (CECILIA *et al.*, 2020). Como exemplo de catalisadores químicos utilizados nesses processos tem-se os catalisadores homogêneos ácidos (HCl, H₂SO₄ e H₃PO₄) e básicos (NaOH e KOH). Como exemplo de catalisadores heterogêneos tem-se as resinas catiônicas, óxidos e bases (ANGULO *et al.*, 2020). A utilização desses catalisadores, por sua vez, apresenta adversidades devido à necessidade de condições reacionais intensas (temperaturas elevadas na faixa de 120 a 180°C) para a obtenção de elevados rendimentos ou conversão (IVAN-TAN *et al.*, 2017; SABOYA *et al.*, 2016; SABOYA *et al.*, 2017a). Dessa maneira, as lipases surgem como uma alternativa mais sustentável e ambientalmente correta em relação aos catalisadores químicos (BOLINA *et al.*, 2021).

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são um grupo de enzimas capazes de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em meio aquoso e reações de esterificação, transesterificação e interesterificação em meio não aquoso (JAVED *et al.*, 2018; THANGARAJ *et al.*, 2019; CHANDRA *et al.*, 2020). Entre as lipases utilizadas em âmbito industrial pode-se destacar a LCR (lipase de *Candida rugosa*), TLL (lipase de *Thermomyces lanuginosus*), LBC (lipase de *Burkholderia cepacia*) entre outras (LAGE *et al.*, 2016; DA SILVA *et al.*, 2020; CAVALCANTI *et al.*, 2018). A utilização das lipases em sua forma livre (extratos enzimáticos brutos na forma líquida ou em pó) não é viável do ponto de vista industrial devido às dificuldades de recuperação, baixa estabilidade térmica e baixa atividade catalítica em reações em meio orgânico (CAVALCANTI *et al.*, 2018; THANGARAJ *et al.*, 2019; ZHONG *et al.*, 2020). Dessa maneira, torna-se necessário realizar a imobilização dessas enzimas por diferentes protocolos para que as lipases possam ser recuperadas e reutilizadas por diversos ciclos, reduzindo o custo do processo e prevenindo a contaminação do produto final. Além disso, em alguns casos os processos de imobilização podem aumentar a estabilidade catalítica, tornando o catalisador mais robusto (GRECO-DUARTE *et al.*, 2017; REIS *et al.*, 2019; BILAL *et al.*, 2018).

Diversos métodos de imobilização de enzimas podem ser utilizados para as lipases. Protocolos como adsorção física, encapsulação, ligação covalente e reticulação. A simplicidade e o baixo custo do processo tornam a imobilização por

adsorção física em suportes hidrofóbicos a mais utilizada (MULINARI *et al.*, 2020; ZHAO *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2020). Nesse protocolo, é possível alcançar a estabilização da lipase e um aumento expressivo da sua atividade catalítica (RODRIGUES *et al.*, 2019). Além disso, as lipases apresentam um mecanismo específico de ação denominado ativação interfacial, o que favorece esse protocolo de imobilização (BOLINA *et al.*, 2021).

A maioria das lipases possui uma cadeia polipeptídica, denominada tampa ou aba (lid), que tem uma face hidrofílica e uma face hidrofóbica. Na conformação fechada das lipases, a área hidrofóbica da lid interage com as áreas hidrofóbicas no entorno do sítio ativo, tornando-se inacessível às moléculas de substrato. Na presença de uma interface hidrofóbica, como suportes ou gotículas de óleo, essa tampa é capaz de se mover, expondo o sítio ativo e a sua região hidrofóbica para o meio (conformação aberta). Em meios com alta concentração de íons, as lipases encontram-se preferencialmente na conformação fechada devido à forte agregação destas enzimas – formação de agregados bimoleculares. Dessa maneira, utiliza-se um meio de baixa força iônica no processo de imobilização via ativação interfacial em suportes hidrofóbicos a fim de deslocar o equilíbrio conformação fechada/aberta e evitar a sua agregação (MANOEL *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019; MACHADO *et al.*, 2019).

Para realizar o processo de imobilização são necessários suportes, que devem apresentar alta área específica e tamanho de poros para garantir um biocatalisador com alta atividade catalítica e minimizar as limitações difusionais (MANOEL *et al.*, 2015; BASSI *et al.*, 2016; MULINARI *et al.*, 2020). Entre os suportes mais utilizados figuram os orgânicos – resinas acrílicas e hidrogéis de quitosana- e os inorgânicos – sílicas, zeólitas e aluminas (BEZERRA *et al.*, 2015; MANOEL *et al.*, 2015; ZUCCA *et al.*, 2014; VERMA *et al.*, 2019; MULINARI *et al.*, 2020).

No que diz respeito à imobilização via adsorção física, diversos suportes hidrofóbicos tem sido investigados, como poli-metacrilato, sílica funcionalizada, partículas magnéticas, poli-hidroxibutirato, carbono ativado e resina de poli(estireno-divinilbenzeno) (ALVES *et al.*, 2017). O poli(estireno-divinilbenzeno) vem sendo bastante estudado e considerado promissor para a imobilização de lipases. A alta

capacidade de adsorção deste suporte se deve à sua elevada área específica (500 m²/g) e aos grandes diâmetros de poros (250 Å) (ALVES *et al.*, 2017; BENTO *et al.*, 2017; CORREA *et al.*, 2021).

Neste contexto, o objetivo da presente dissertação de mestrado consistiu no desenvolvimento de um processo sustentável e ecologicamente correto de produção de ésteres lubrificantes por hidroesterificação de óleo residual de fritura. Os ésteres foram produzidos por um processo sequencial de produção de AGL por hidrólise enzimática do óleo residual de fritura, seguido de esterificação enzimática dos ácidos graxos livres com etileno glicol em meios isentos de solventes orgânicos. A aplicação do extrato enzimático bruto de lipase de *Candida Rugosa*, uma lipase microbiana não-específica, como biocatalisador na produção de AGL é devida à sua versatilidade e alta atividade catalítica na hidrólise completa de diferentes óleos (BARBOSA *et al.*, 2019). Na etapa de esterificação, foi empregada a preparação enzimática comercial Eversa[®] Transform 2.0, nas formas solúvel e imobilizada por adsorção física em partículas de poli(estireno-divinilbenzeno), como biocatalisador. Esta preparação enzimática é disponível na forma líquida e é uma variante da lipase de *Thermomyces lanuginosus* expressa em *Aspergillus oryzae* fornecida pela Novozymes desde 2014 (MONTEIRO *et al.*, 2020). A Eversa[®] Transform 2.0 tem sido amplamente empregada na produção de biodiesel a partir de diferentes matérias-primas – óleos vegetais e residuais (MONTEIRO *et al.*, 2020). Entretanto, a sua aplicação na produção de biolubrificantes ainda é escassa. Em consulta à Base de Dados *Scopus*, foi encontrado apenas um recente estudo de aplicação desta preparação de lipase na forma imobilizada por reticulação (*Cross-linked Enzyme Aggregates*) para transesterificação de óleo residual de fritura com álcool isoamílico (GUIMARÃES *et al.*, 2021). O caráter diferencial desta proposta é a aplicação de Eversa[®] Transform 2.0 imobilizada por adsorção física em partículas de poli(estireno-divinilbenzeno). Além disso, foi empregado EG devido às excelentes propriedades dos biolubrificantes obtidos como alta biodegradabilidade, boa estabilidade térmica, alto ponto de fulgor e baixa volatilidade (SHABA *et al.*, 2018; SUKIRNO & FARHANDIKA, 2020).

O objetivo geral desse trabalho foi alcançado mediante a execução dos objetivos específicos descritos a seguir.

- Produção de AGL a partir da hidrólise enzimática do óleo de fritura catalisada por LCR;
- Imobilização da preparação enzimática Eversa[®] Transform 2.0 por adsorção física em partículas de poli (estireno-divinilbenzeno);
- Determinação dos parâmetros de imobilização em termos de concentração de proteína imobilizada e atividade na hidrólise da emulsão de azeite de oliva;
- Aplicação do biocatalisador heterogêneo preparado na produção de biolubrificantes por esterificação de AGL e diferentes glicóis em meios isentos de solventes;
- Avaliação da influência de fatores como razão molar EG:AGL, concentração do catalisador e temperatura por delineamento composto central rotacional (DCCR).
- Avaliação do tempo de reação na produção de ésteres nas condições otimizadas;
- Realização de testes de reuso após sucessivas bateladas de reação nas condições experimentais otimizadas previamente selecionadas.
- Identificação dos diésteres produzidos por ressonância magnética nuclear
- Caracterização de suas propriedades físicas (viscosidade cinemática, índice de viscosidade, densidade e ponto de fluidez) de acordo com metodologias padrão.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

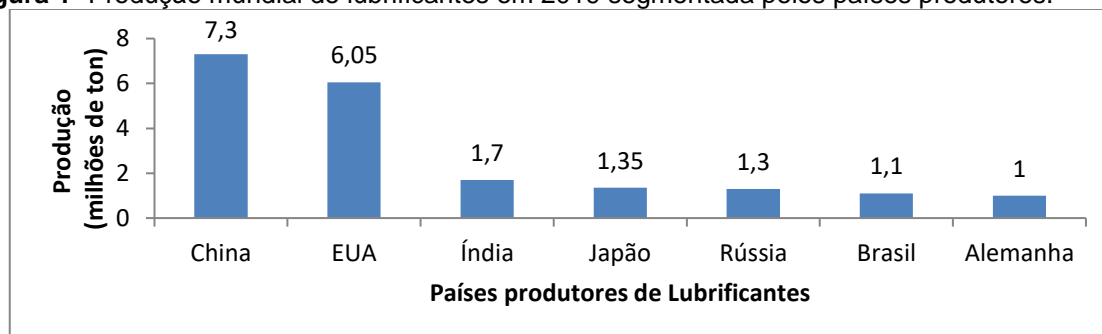
2.1 LUBRIFICANTES

Os lubrificantes são compostos orgânicos utilizados para lubrificar peças de máquinas, a fim de reduzir o atrito entre elas e conseqüentemente aumentando sua vida útil (KARMAKAR *et al.*, 2017). Esses materiais são amplamente utilizados no meio industrial e automotivo, destacando-se os fluídos e óleos utilizados em motores, turbinas, engrenagens, compressores e ferramentas pneumáticas (SINGH *et al.*,2019).

Para que uma substância seja considerada um bom lubrificante, ela deve apresentar algumas características como alto índice de viscosidade e fluidez em uma ampla faixa de temperatura. Além disso, a eficiência de lubrificação também está associada à estabilidade térmica, à capacidade de prevenção à corrosão e à resistência à oxidação (PANCHAL *et al.*,2017).

Segundo a Grand View Research Inc (2020), o mercado mundial de lubrificantes gerou receita de \$126.5 bilhões no ano de 2019. Além disso, estima-se que a produção desses compostos será de cerca de 43.87 milhões de toneladas em 2022, valor esse que representa uma taxa de crescimento de 2,4% do mercado. Em 2019, a China liderou o mercado de lubrificantes, seguida pelos Estados Unidos, Índia, Japão, Rússia, Brasil e Alemanha (STATISTA, 2020). Na Figura 1, pode-se observar a produção mundial de lubrificantes em 2019, segmentada pelos países produtores.

Figura 1- Produção mundial de lubrificantes em 2019 segmentada pelos países produtores.



Fonte: Do autor.

Um grande problema, relacionado aos lubrificantes, se encontra no seu descarte inadequado no meio ambiente. Estima-se que 40 a 55% de todo lubrificante consumido mundialmente é descartado de maneira incorreta no ambiente aquático, no solo e na atmosfera (SYAHIR *et al.*,2017). Outro fator alarmante é que mais de 95% desses lubrificantes são de origem fóssil, causando sérios problemas aos ecossistemas devido à alta toxicidade e baixa biodegradabilidade (REEVES *et al.*, 2017)

O esgotamento progressivo dos combustíveis fósseis bem como a crescente preocupação com o impacto negativo desses combustíveis no meio ambiente levou à necessidade crítica de explorar fontes alternativas de energia (ZAINAL, 2018). Surge então o interesse por compostos de origem renovável como lubrificantes ecologicamente corretos chamados de biolubrificantes.

2.2BIOLUBRIFICANTES

O termo “biolubrificante” aplica-se a todos os lubrificantes que sejam biodegradáveis e produzidos por fontes renováveis e sustentáveis, de maneira que seja garantida a reinserção da sua matéria orgânica no ciclo natural do carbono, causando assim um baixo impacto ao meio ambiente (REEVES *et al.*, 2017).

Os biolubrificantes podem ser divididos em duas categorias – os óleos naturais e os óleos sintéticos. Os óleos naturais, também conhecidos como ésteres naturais ou triacilgliceróis (TAG), são representados pelos óleos vegetais ou microbianos (comestíveis ou não), gorduras animais, ácidos graxos livres (AGL) e óleos residuais (CHAN *et al.*,2018). Já os óleos sintéticos compreendem as polialfaolefinas, ésteres sintéticos, polialquilenoglicóis, silicones, entre outros (KARMAKAR *et al.*, 2017).

2.2.1 Óleos vegetais

Uma atenção maior é dada aos óleos vegetais, devido à sua extensa gama de origens bem como sua ampla produção. Esses óleos apresentam regiões polares e apolares em suas estruturas, sendo a região polar responsável pela adsorção ou adesão na superfície deslizante, enquanto a região apolar é responsável pela resistência e oleosidade do fluido lubrificante (ZAINAL *et al.*, 2018).

A utilização direta dos óleos vegetais como lubrificantes apresenta certas desvantagens, como por exemplo, sua instabilidade termo-oxidativa e hidrolítica, sua alta viscosidade e sua baixa compatibilidade com tintas e selantes (MOBARAK *et al.*, 2014; DA SILVA *et al.*, 2015; SYAHIR *et al.*, 2017; ZAINAL *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018). Dessa maneira, tem-se que o uso direto de óleos vegetais como lubrificantes não é apropriado. Para serem utilizados para esse propósito eles devem ser primeiramente modificados quimicamente (KARMAKAR *et al.*, 2017; REEVES *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2018; KUMAR E PAL, 2021).

2.2.1.1 Óleo de soja

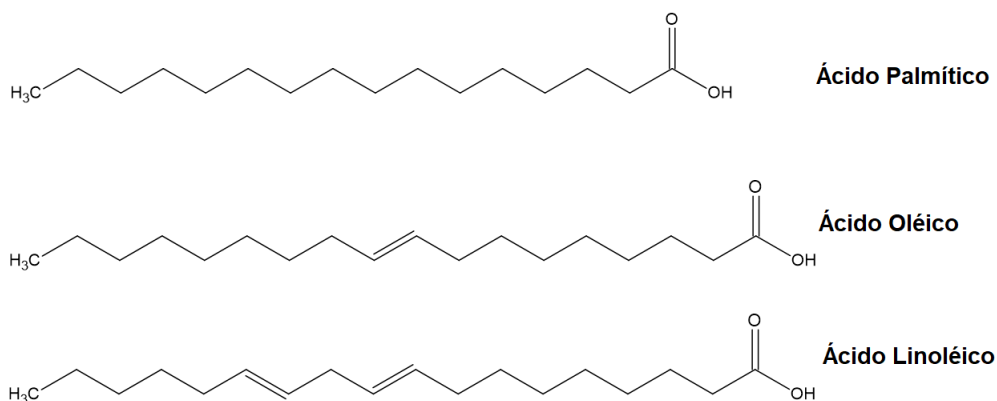
A soja é uma das principais fontes na produção mundial de óleos vegetais, representando 60% desse mercado. Em 2018, essa produção excedeu as 56 milhões de toneladas (XU *et al.*, 2020). Essa alta representatividade da soja se deve às suas características de mercado e à qualidade do óleo fornecido (SUBROTO *et al.*, 2020). O grão de soja tem como principal componente a proteína vegetal (40%), porém a presença de óleos nesses grãos é muito significativa, podendo variar de 18 a 22% (SUBROTO e QONIT, 2020).

O óleo de soja consiste em cerca de 90 a 95% de triacilgliceróis, mas também contém componentes como fosfatídeos, esteróis, tocoferóis e outros compostos solúveis em gordura. No que diz respeito ao perfil graxo, sua composição se baseia em ácido linoléico (54,17%), ácido oléico (24,77%) e ácido palmítico

(11,67%) (DORNI *et al.*, 2018). Na Figura 2, observa-se as estruturas dos ácidos graxos componentes do óleo de soja.

Além da sua ampla produção, o óleo de soja apresenta algumas vantagens quando comparado a outros óleos vegetais, incluindo alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (65%), mantendo-o líquido a temperaturas mais baixas e a possibilidade de serem hidrogenados de forma seletiva (SUBROTO *et al.*, 2020).

Figura 2- Estrutura química dos ácidos graxos componentes do óleo de soja.



Fonte: Do autor.

2.2.1.2 Modificação química dos óleos vegetais

Existem diversos métodos para a modificação química de diferentes triacilgliceróis, de modo a torná-los aptos a serem utilizados como lubrificantes. Entre eles encontram-se a transesterificação, esterificação, hidroesterificação, e epoxidação seguido de ruptura do anel epóxi (CECILIA *et al.*, 2020; BOLINA *et al.*, 2021).

Entre os processos de modificação química dos óleos vegetais destaca-se a hidroesterificação, responsável pela modificação química de qualquer matéria-prima graxa (gordura animal, óleo vegetal, óleo de fritura usado, borras ácidas de refino de óleos vegetais, entre outros) para obtenção de biolubrificantes (BRESSANI *et al.*, 2015; POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016). Nesse processo, primeiramente as matérias graxas são convertidas em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol por reação de hidrólise. Em seguida, os ácidos graxos livres são

extraídos do meio reacional e convertidos em ésteres por esterificação direta em meio orgânico (BRESSANI *et al.*, 2015; CAVALCANTI *et al.*, 2018; SARNO *et al.*, 2019). Esse processo tem como vantagem o fato de não produzir sabões, subprodutos obtidos pela reação de catalisadores alcalinos com os ácidos graxos, que normalmente são produzidos nas reações de transesterificação (DE LACERDA *et al.*, 2019). Além disso, o processo de transesterificação direta, apesar de possuir apenas uma etapa, possui problemas de transferência de massa devido à alta viscosidade do óleo base, sendo necessário um grande tempo reacional (DA SILVA *et al.*, 2015). Por fim, o processo de hidroesterificação produz glicerol com alta pureza, característica essa muito importante para propósitos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios (POURZOLFAGHAR *et al.*, 2016).

2.2.1.3 Vantagens e Desvantagens dos óleos vegetais

Os biolubrificantes produzidos de óleos vegetais são alternativas promissoras aos lubrificantes de origem mineral devido às suas altas performances de lubrificação, alto índice de viscosidade, alto ponto de fulgor, baixo ponto de fluidez e baixas perdas por volatilização (HO *et al.*, 2019). As desvantagens se concentram no custo dos mesmos. A utilização de óleos vegetais refinados para a produção de lubrificantes é um grande desafio econômico, visto que compete com a indústria de alimentos (XIE E WAN, 2020). Neste sentido, a utilização de óleos não comestíveis ou residuais pode reduzir o custo de produção dos lubrificantes em cerca de 80% (SARNO *et al.*, 2019). Essa discussão põe em evidência a utilização de óleos residuais como uma opção atrativa dos pontos de vista ambiental e econômico para esta finalidade.

2.2.2 Óleos residuais

A produção anual global de óleos residuais de fritura ultrapassa 16 milhões de toneladas (LINYUN *et al.*, 2021). Esses óleos e gorduras, utilizados repetidamente em frituras, sofrem alterações significativas em suas

propriedades, devido à degradação térmica dos triacilgliceróis por oxidação e hidrólise (DI PIETRO *et al.*, 2020).

Dentre essa grande produção de óleos residuais, a maior parte é descartada de maneira inadequada na natureza. Aproximadamente 15 milhões de toneladas de óleos processados em todo o mundo são lançados anualmente sem nenhum tipo de tratamento no meio ambiente (MANSIR *et al.*, 2018). Esses óleos são grandes poluidores de cursos d'água, o que pode ser confirmado pelo fato de que apenas um litro de óleo de fritura é capaz de esgotar o oxigênio dissolvido de até 20 mil litros de água, formando, em poucos dias, uma fina camada sobre uma superfície de 100 m² que bloqueia a passagem de ar e luz e, conseqüentemente, impede a respiração e a fotossíntese (BIOCOLETA, 2013).

O óleo de cozinha usado, bem como óleos não comestíveis são matérias-primas atrativas para a produção de biodiesel, por aumentarem a viabilidade econômica do processo (AMBAT, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2020). O biodiesel nada mais é que um éster monoalquílico de ácidos graxos de cadeia longa oriundo da transesterificação de óleos naturais, processo que se assemelha à produção de biolubrificantes (SINGH *et al.*, 2019). Além disso, esses óleos não concorrem com o mercado de abastecimento de alimentos, portanto, sendo de grande interesse (SARNO *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020b). O desenvolvimento de novos produtos eficientes e viáveis ambientalmente como os biolubrificantes à base de óleo de fritura acabam por reduzir a dependência por recursos não renováveis, como o petróleo e seus derivados (REEVES *et al.*, 2017; SARNO *et al.*, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2020).

Os processos de modificação química, para tornar viável a utilização desses óleos residuais como lubrificantes, requerem a utilização de catalisadores, podendo eles serem químicos ou enzimáticos (SYAHIR *et al.*, 2017; KARKAMAR *et al.*, 2017; CECILIA *et al.*, 2020).

2.3 CATALISADORES PARA A FABRICAÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES

A catálise é um procedimento muito utilizado em diversos ramos industriais. Exemplos de aplicações da mesma podem ser vistas na indústria alimentícia, processamento de papel e celulose, biocombustíveis, tratamento de esgoto, farmacêutica e de química fina (SINGH *et al.*, 2016).

A catálise na produção de biolubrificantes pode ser classificada de diversas maneiras. Dentre elas destacam-se a fase na qual se encontram os catalisadores (homogênea e heterogênea) e a origem dos mesmos (enzimática ou química).

2.3.1 Catálise Química: homogênea x heterogênea

De forma geral, as reações catalíticas podem ser classificadas em homogêneas ou heterogêneas, sendo a principal diferença entre elas a fase na qual o catalisador se encontra em relação aos reagentes.

No que diz respeito à produção de biolubrificantes, os catalisadores químicos homogêneos mais utilizados são os ácidos fosfórico, clorídrico, p-toluenossulfônico e sulfúrico, bem como as bases – hidróxidos e alcóxidos de sódio e potássio (ARAVIND *et al.*, 2018; AFIFAH *et al.*, 2019; GHAFAR *et al.*, 2019; ATTIA *et al.*, 2020). As principais vantagens da utilização de catalisadores homogêneos estão no seu baixo custo e suas altas taxas de cinética de reação (DA SILVA *et al.*, 2013; THANGARAJ *et al.*, 2019; THANGARAJ E SOLOMON, 2019). As desvantagens, porém, desse tipo de catalisador são os problemas operacionais causados devido à difícil regeneração do meio reacional, dificultando o reuso do catalisador, bem como a alta demanda de água e energia nos processos necessários para a purificação dos produtos (CHUA *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2019; FARUQUE *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2020).

Entre os catalisadores heterogêneos mais utilizados na síntese de biolubrificantes destacam-se as resinas de troca iônica (SABOYA *et al.*, 2017a), carvões ativadas sulfonadas (FERREIRA *et al.*, 2020), zircônia sulfatada (OH *et al.*, 2013), sílica funcionalizada com ácido sulfúrico (AKERMAN *et al.*, 2011), bem como as bases – metóxido de magnésio, óxido de cálcio e óxidos mistos - CaO-SrO (IVAN-TAN *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2021; ALMASI *et al.*, 2021). Os

catalisadores heterogêneos têm como principal vantagem permitir uma fácil separação do produto obtido, facilitando assim o reuso subsequente do catalisador e reduzindo os custos dos processos de purificação (GUPTA *et al.*, 2020). Além disso, esse tipo de catalisador provoca uma menor corrosão dos equipamentos utilizados, se comparado aos catalisadores homogêneos. A desvantagem da utilização de catalisadores heterogêneos está na necessidade de condições reacionais como altas temperaturas para reduzir a viscosidade do meio reacional e melhorar os processos de transferência de massa. As altas temperaturas levam à degradação térmica de ácidos graxos e triacilgliceróis, sendo necessário assim realizar etapas posteriores de purificação, aumentando a geração de resíduos (SABOYA *et al.*, 2017b; IVAN-TAN *et al.*, 2017; FATTAH *et al.*, 2020; ZHANG *et al.*, 2020b). A Tabela 1 fornece um comparativo entre as características de ambas as catálises.

Tabela 1- Comparação entre a catálise homogênea e heterogênea.

Catálise Homogênea	Catálise Heterogênea
Maior contato entre substratos e catalisador	Menor contato entre substratos e catalisador
Maior desempenho catalítico	Menor desempenho catalítico
Permite altas seletividades	Não permite altas seletividades
Difícil separação do produto	Fácil separação do produto
Difícil recuperação do catalisador	Fácil recuperação do catalisador
Alta geração de efluentes para purificação do produto	Baixa geração de efluentes para separação do produto

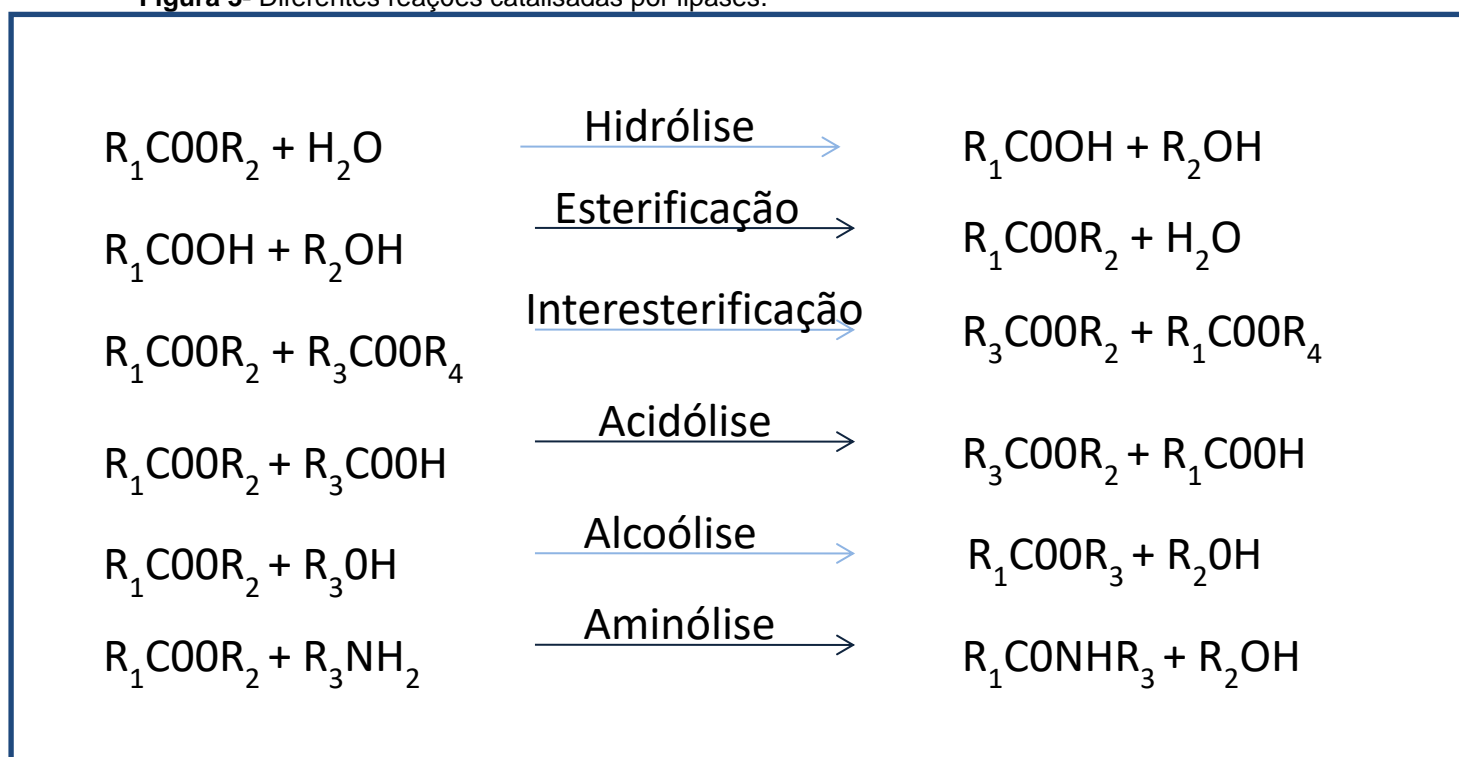
Fonte: Do Autor.

2.3.2 Catálise enzimática: Lipases

A catálise enzimática, para a produção de biolubrificantes, vem como uma alternativa atrativa aos catalisadores químicos, visto que requer condições reacionais moderadas de temperatura e pressão, além de apresentar alta especificidade e alto grau de pureza dos produtos – reduzindo a geração de resíduos e tornando os processos ambientalmente corretos (CERÓN *et al.*, 2018; PAPADAKI *et al.*, 2019; SARNO *et al.*, 2019; AGUIEIRAS *et al.*, 2019; FERNANDES *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2021; BOLINA *et al.*, 2021)

As lipases (éster triacilglicerol acil-hidrolases EC 3.1.1.3) são um importante grupo de enzimas que podem ser obtidas de fontes animais, vegetais e microbianas, sendo as de fontes microbianas as mais utilizadas no âmbito industrial devido à sua grande diversidade bioquímica, fácil manipulação genética e fáceis condições de cultivo (SALIHU E ALAM, 2015; JEMLI *et al.*, 2016; JAVED *et al.*, 2018). Essas enzimas são capazes de catalisar diversos tipos de reações como a hidrólise dos triacilgliceróis em glicerol e ácidos graxos livres (ANGAJALA *et al.*, 2016; SHUAI *et al.*, 2017; JAVED *et al.*, 2018; BASSO E SERBAN, 2019), além de processos de esterificação, transesterificação e interesterificação em meios não aquosos (ABED *et al.*, 2018; BARSÉ *et al.*, 2019; LÖFGREN *et al.*, 2019). A Figura 3 esquematiza a versatilidade de reações que podem ser catalisadas pelas lipases.

Figura 3- Diferentes reações catalisadas por lipases.



Fonte: Do autor

Entre as aplicações das lipases, encontra-se a produção de biolubrificantes, e a sua utilização para este fim é bastante reportada pela literatura (BOLINA *et al.*, 2021). Na Tabela 2, podemos ver alguns exemplos de trabalhos relacionados a essa temática.

Tabela 2-Reações catalisadas por lipases para produção de biolubrificantes.

Reação	Fonte da Lipase	Óleo/Ácido	Álcool	Éster	Conversão (%)	Referência
Esterificação	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Ácido Butírico	Isoamílico	Butirato de isoamila	96.0	Todero <i>et al</i> (2015)
		Ácido Oléico/Ácido Octanoico/Ácido Esteárico	Cetílico	Oleato de cetila/Octanoato de cetila/Estearato de cetila	94.0	Machado <i>et al</i> (2019)
		Ácido Esteárico	Butanol	Estearato de butila	90.0	Bolina <i>et al</i> (2018)
		Ácido Decanóico	Cetílico	Decanoato de cetila	92.5	Alves <i>et al</i> (2016)
Transesterificação	Pâncreas de porco	Óleo de Karanja	Etanol	Oleato de etila	88.0	Kumar e Pal(2021)
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de Palmiste	Isoamílico	Oleato de isoamila	99.5	Cerón <i>et al</i> (2018)
Hidroestriificação	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de Fritura	Etanol	Oleato de etila /Linoleato de etila	94.1	Costa <i>et al</i> (2020)
	<i>Candida rugosa</i>	Óleo de Soja	Neopentilglicol	Oleato de n-octila	99.0	Cavalcanti <i>et al</i> (2018)
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de Soja	Metanol	Oleato de metila	97.1	Wancura <i>et al</i> (2019)

Fonte: Do Autor.

A aplicação de lipases na forma de extratos enzimáticos brutos (formulações em pó ou líquida) é dificultada em um processo industrial, pois torna difícil a recuperação e reciclagem da enzima, causa custos elevados na purificação do produto e leva a uma grande inativação das lipases devido à temperatura e uso de solventes orgânicos (MOHAMAD, 2015; ZHAO *et al.*, 2015; ZHONG *et al.*, 2020). Dessa maneira, surge a necessidade de realizar algum procedimento, a fim de minimizar essas complicações industriais e permitir o reuso dessas enzimas, procedimento este denominado imobilização.

2.4 IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES POR DIFERENTES PROTOCOLOS

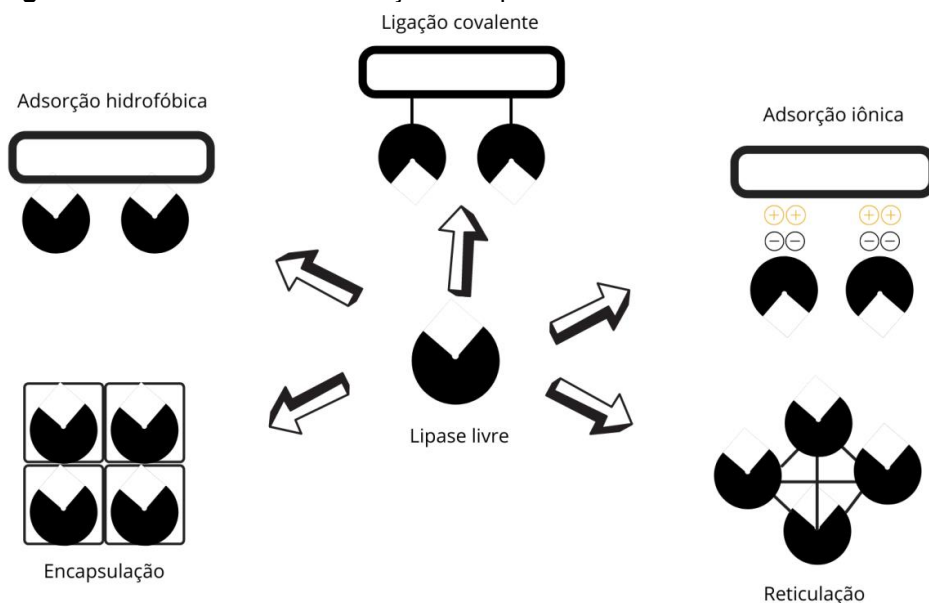
A imobilização enzimática permite a regeneração e reuso das enzimas em diversos ciclos reacionais, previne a contaminação do produto final, gera robustez devido ao aumento da estabilidade, bem como permite o desenvolvimento de processos contínuos, processos esses muito atrativos

industrialmente. (CERÓN *et al.*, 2018; ZHONG *et al.*, 2020).O processo de imobilização enzimática se baseia no confinamento de enzimas em certos materiais ativos ou por ligação com matrizes específicas, permitindo que as mesmas realizem suas funções com uma menor tendência à inativação e sendo preservadas por um maior tempo (GIRELLI *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2020; KHAN, 2021).

2.4.1 Protocolos de imobilização

Existem diversos protocolos nos quais as lipases podem ser imobilizadas, entre eles destacam-se a encapsulação, a imobilização por ligação covalente, a imobilização por reticulação (*Cross-linked Enzymes Aggregates – CLEAs*) e a adsorção física (iônica, hidrofóbica e por ligação de hidrogênio).Na Figura 4, pode-se observar um esquema desses protocolos de imobilização.

Figura 4- Protocolos de imobilização de Lipases.



Fonte: do autor

A escolha apropriada do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como a máxima atividade catalítica da enzima imobilizada, estabilidade operacional, custo de imobilização, toxicidade dos reagentes e propriedades desejadas para o catalisador imobilizado (BOLINA *et al.*, 2021).

O processo de encapsulação se baseia no confinamento da enzima em uma rede polimérica porosa que permite a difusão das moléculas de substrato para o microambiente reacional e a difusão de moléculas de produtos do mesmo (MULINARI *et al.*, 2020). Nesta técnica são utilizados, normalmente, polímeros naturais como quitosana, alginato e celulose, bem como os sintéticos - poliuretano e poliacrilamida (KOUKLUKAYA *et al.*, 2016;JI *et al.*, 2017; PADILHA *et al.*, 2018; KAUSHAL *et al.*, 2018). Como vantagens desse método, destacam-se a estabilidade enzimática devido ao fato de não serem formadas ligações químicas ou interações físicas entre a enzima e o suporte, além da grande quantidade de sítios de interação entre substrato e enzima (FENG *et al.*, 2015). Já como desvantagem pode-se citar a alta resistência à transferência de massa para o substrato e uma possível liberação de enzimas da estrutura após sucessivos ciclos (REIS *et al.*, 2019).

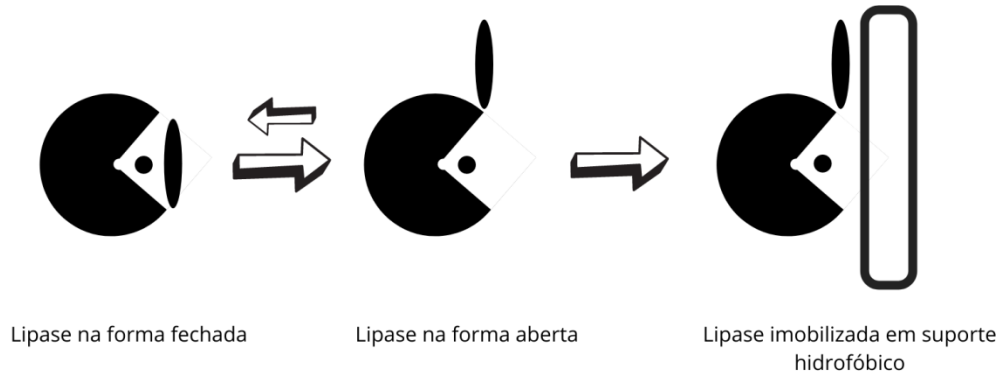
A imobilização de enzimas por ligações covalentes acontece pela formação de ligações entre os resíduos de aminoácidos que constituem a enzima, e que não são essenciais para sua atividade catalítica, e os grupos reativos atuais na superfície do suporte (NADAR e RATHOD, 2018; ZHONG *et al.*, 2019; BASHIR *et al.*, 2020). A vantagem deste processo é fornecer uma maior estabilidade enzimática em relação ao ambiente reacional, como variação de pH, temperatura, solventes e ação de inibidores, além de evitar a dessorção da enzima do suporte (POPPE *et al.*, 2015; ZDARTA *et al.*, 2018; DE SOUZA *et al.*, 2020). As principais desvantagens dessa técnica estão relacionadas às condições rigorosas de preparo, que se utilizam de reagentes tóxicos, o que acaba por elevar os custos de obtenção destes materiais (ABDULLA *et al.*, 2017; THANGARAJ E SOLOMON, 2019; DE ANDRADES *et al.*, 2019).

No método de imobilização por reticulação, não há a presença de suportes. Nesse processo, a utilização de solventes orgânicos (acetona, etanol, etc), sais ou polímeros leva à precipitação das enzimas. Posteriormente, um agente reticulante (usualmente o glutaraldeído) é adicionado, resultando na formação de um agregado de enzimas (MUKHERJEE E GUPTA, 2017; SHELDON, 2019; NAIR E CHELLAPAN, 2019). Este método é considerado de grande importância no preparo de biocatalisadores para serem utilizados em processos industriais (ZHENG *et al.*, 2018; SHELDON, 2019).

A adsorção física, por sua vez, é um método muito utilizado na imobilização de lipases devido a sua simplicidade e baixo custo. Como vantagens desse procedimento destacam-se a preservação da conformação tridimensional da enzima, bem como um fácil reuso do suporte por dessorção das enzimas inativas, estabilização enzimática e aumento da atividade catalítica. (MIGUEZ *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2019; OKURA *et al.*, 2020). Esse protocolo de imobilização pode ser explicado por diferentes tipos de interações como as forças de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações iônicas e hidrofóbicas. Essas interações irão depender dos grupos funcionais presentes na superfície do suporte e da composição dos aminoácidos presentes na superfície da lipase (MOHAMAD *et al.*, 2015; REIS *et al.*, 2019; QUAYSON *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que no campo das lipases, a adsorção por interações hidrofóbicas é mais comum, devido ao seu mecanismo específico de ação que é denominado ativação interfacial (BASSI *et al.*, 2016). Muitas lipases possuem uma cadeia polipeptídica, denominada aba ou tampa (lid), que possui tanto uma região hidrofóbica, quanto uma região hidrofílica. Quando a lipase se encontra na chamada conformação fechada, a área hidrofóbica da aba interage com as áreas também hidrofóbicas no entorno dos sítios ativos das lipases, cobrindo-os e conseqüentemente impedindo o contato dos mesmos com o meio reacional (RODRIGUES *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2019). Porém, na presença de uma superfície hidrofóbica, a cadeia polipeptídica se desloca, expondo os sítios ativos da enzima para o meio – conformação aberta. Em meios na qual a força iônica é elevada (acima de 50 mM), a conformação aberta da lipase torna-se instável, dessa maneira a mesma toma a sua conformação fechada. A fim de evitar uma baixa atividade catalítica devido à conformação fechada, bem como reduzir a agregação das lipases na sua forma aberta, são utilizados meios com baixa força iônica. (MANOEL *et al.*, 2015; MACHADO *et al.*, 2019). A Figura 4 mostra um esquema da ativação interfacial de enzimas em suportes hidrofóbicos.

Figura 5- Lipase immobilizada via ativação interfacial em superfície hidrofóbica.



Fonte: do autor

Uma das desvantagens desse método é a possibilidade de dessorção enzimática da superfície do suporte devido às mudanças de temperatura, pH, força iônica ou pela presença de substâncias químicas como surfactantes, uréia e co-solventes (FILHO *et al.*, 2019). Além disso, a tendência das lipases de adsorverem em suportes hidrofóbicos pode gerar a formação de dímeros de lipase, devido à agregação de lipases em sua conformação aberta que não se encontram fixadas na superfície do suporte. As lipases também podem ser adsorvidas em outras proteínas como algum produto gerado na reação, competindo assim pelo sítio ativo com o substrato, reduzindo o rendimento reacional (MANOEL *et al.*, 2015;ZHANG *et al.*, 2017).

2.4.2 Suportes

As características a serem analisadas na seleção de um suporte para imobilização de enzimas são a área superficial, a permeabilidade, a capacidade de regeneração, a morfologia e a composição, a natureza hidrofílica ou hidrofóbica, a resistência mecânica, entre outras (CANTONE *et al.*, 2013; SIGURDARDÓTTIR *et al.*, 2018; SASTRE *et al.*, 2019; MULINARI *et al.*, 2020).

Os suportes podem ser classificados como orgânicos e inorgânicos, de acordo com suas características químicas, e podem ser subdivididos em naturais ou sintéticos. Suportes naturais possuem facilidade na degradação sem causar

danos ao meio ambiente, além de possuírem baixo custo. Os suportes sintéticos, por sua vez, podem ser combinados com uma variedade de propriedades físicas e químicas de tal modo a formar um suporte ideal para uma aplicação específica (MOHAMAD *et al.*, 2015; GHOLAMZADEH *et al.* 2017; VERMA *et al.*, 2019). Dentre os suportes orgânicos destacam-se os polímeros, naturais ou sintéticos, que são amplamente utilizados no campo da imobilização de biocatalisadores. Como exemplos desses suportes pode-se citar a agarose, a quitosana, resinas acrílicas e nanomateriais (LAGE *et al.*, 2016; BASSI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2017; ORTIZ *et al.*, 2019). Os suportes inorgânicos são amplamente utilizados em aplicações industriais por apresentarem excelentes propriedades mecânicas, alta relação área superficial/ tamanho de poro, alta estabilidade de encubação em solventes orgânicos e por serem de fácil funcionalização com uma variedade de componentes (MULINARI *et al.*, 2020). Exemplos desses suportes são as sílicas, as argilas, as aluminas e as zeólitas (CARVALHO *et al.*, 2015; GHOLAMZADEH *et al.*, 2017; DARONCH *et al.*, 2020).

Independente da natureza do suporte, a classificação do mesmo pode ser realizada levando em consideração também a sua morfologia. Nessa classificação os suportes podem ser porosos e não porosos. Os materiais porosos apresentam uma grande área superficial interna disponível para a imobilização das enzimas, protegendo-as dos efeitos de agitações vigorosas. Uma limitação desses materiais são os tamanhos de poros, que devem ser grandes o suficiente para a acomodação das enzimas e o posterior acesso das moléculas de substrato (MOHAMAD *et al.*, 2015; SIGURDARDÓTTIR *et al.*, 2018; REN *et al.*, 2020). No que diz respeito aos materiais não-porosos, é eliminado o problema de transporte interno de massa, porém existe uma pequena área superficial disponível para que a enzima possa se ligar (SANTOS *et al.*, 2015). A Tabela 3 demonstra as vantagens e desvantagem da porosidade no processo de imobilização enzimática.

Tabela 3- Vantagens e Desvantagens da porosidade na imobilização.

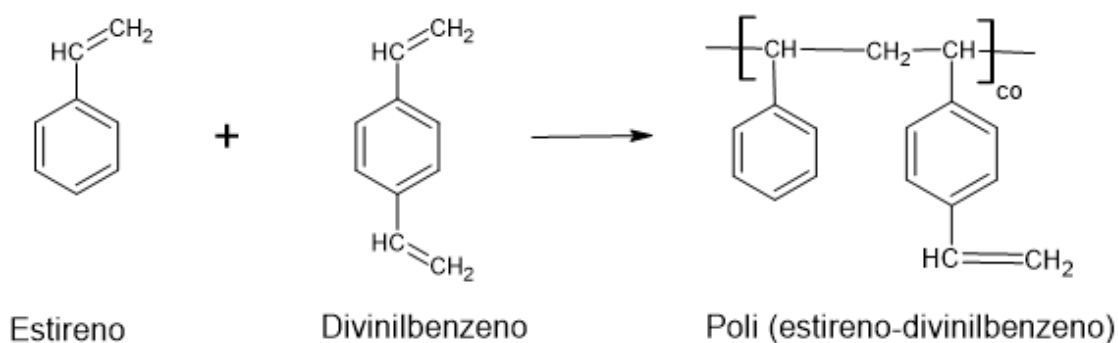
Material	Vantagens	Desvantagens
Poroso	Elevada área superficial interna	Limitações difusionais para o interior dos poros
Não poroso	Maior interação catalisador-substrato devido à acomodação na superfície externa	Pequena área superficial

Fonte: Do autor.

2.4.3 Poli (estireno-divinilbenzeno)

Dentre os diversos polímeros que podem ser utilizados como suporte para imobilização, o poli (estireno-divinilbenzeno) tem se destacado. Esses suportes são obtidos através da copolimerização do estireno utilizando divinilbenzeno como agente reticulante (RODRIGUES *et al.*,2015). A reação de copolimerização foi esquematizada na Figura 6.

Figura 6- Representação esquemática da reação de copolimerização de estireno com divinilbenzeno.



Fonte: do autor

Esse material é extremamente hidrofóbico, o que permite uma fácil adsorção hidrofóbica de enzimas. Outro fator interessante desse material se encontra nas suas características morfológicas. O poli (estireno-divinilbenzeno) apresenta uma elevada área superficial e possui poros com diâmetros elevados,

o que acarreta em uma elevada capacidade de adsorção desse suporte (ALVES *et al.*, 2017; BENTO *et al.*, 2017; CORREA *et al.*, 2021; MARTINS *et al.*, 2013).

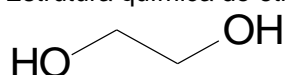
2.5 ÁLCOOIS PARA A SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTES

Como mostrado anteriormente, a produção de biolubrificantes, em sua maioria, se dá pela modificação química de óleos, sendo eles vegetais, animais, residuais ou microbianos. Nos processos mais comuns, como é o caso da transesterificação e da hidroesterificação, é necessário a utilização de alcoóis como reagentes. Entre esses alcoóis se destacam o metanol, etanol e polióis como o etileno glicol, trimetilol propano, pentaeritritol e neopentil glicol (SHABA *et al.*, 2018; SANNI *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2021)

2.5.1 Etileno glicol

Entre os polióis utilizados em processos de modificação química de óleos, o etileno glicol se destaca por possuir uma estrutura ramificada e propriedades anti-congelantes que são consideradas de grande importância para a produção de biolubrificantes (SHABA *et al.*, 2018). A estrutura do etileno glicol pode ser observada na Figura 7.

Figura 7- Estrutura química do etileno glicol.



Fonte: do autor

A utilização de etileno glicol como reagente de esterificação, gera como produto ésteres de etileno glicol, um biolubrificante atóxico, com boa lubricidade devido à sua capacidade de aderência, protegendo assim a superfície de desgastes sob pressão, além de boa estabilidade térmica, alto ponto de fulgor e baixa volatilidade (SUKIRNO & FARHANDIKA, 2020). Na Tabela 4, podemos ver alguns exemplos de trabalhos da literatura que utilizam do etileno glicol para esse fim.

Tabela 4- Estudos utilizando etileno glicol para produção de biolubrificantes.

Matéria-prima	Reação	Catalisador	Condições de reação	Rendimento	Tempo	Referência
Óleo de soja	Transesterificação	Metóxido de sódio	6:1 óleo/álcool; 120°C; 0,4% catalisador m/m	88,30%	3 horas	Sanni <i>et al</i> (2017)
Óleo de palma	Transesterificação	Metóxido de sódio	6:1 óleo/álcool; 120°C; 0,6% catalisador m/m	92%	3 horas	Sanni <i>et al</i> (2017)
Óleo de palma	Transesterificação	Metóxido de sódio	3:1 óleo/álcool; 135°C	81,48%	2 horas e 48 min	Shaba <i>et al</i> (2018)
Óleo de palma de grau industrial	Transesterificação	Catalisador básico	3,5:1 óleo/álcool; 170°C	93%	3 horas	Sukirno & Farhandika (2020)
Ácido Oléico e ácido decanoico	Esterificação	Novozyme 435	6:1 óleo/álcool; 23°C; 5% catalisador m/m	90%	24 horas	Yao <i>et al</i> (2014)
Óleo de fritura usado	Transesterificação	Óxido de cálcio	3,5:1 óleo/álcool; 130°C ; 1,2% catalisador m/m	94%	1 hora e 30 min	Hussei <i>et al</i> (2021)

Fonte: do autor

Essa dissertação de mestrado visa trazer como inovação a utilização da lipase Eversa[®] Transform 2.0, enzima amplamente empregada na produção de biodiesel, na produção de biolubrificantes, aplicação essa que ainda é muito escassa. Essa lipase será imobilizada por adsorção física em partículas de poli (estireno-divinilbenzeno), devido suas características morfológicas e hidrofobicidade. Além disso, será empregado o etileno glicol, como o álcool necessário para o processo de hidroesterificação. Dentre os estudos presentes na literatura, apenas esse trabalho utilizou de catálise enzimática (lipase) com esse diol como reagente, sendo outro ponto diferencial. O mesmo foi selecionado devido às excelentes propriedades dos biolubrificantes como boa estabilidade térmica, alto ponto de fulgor e boa lubricidade obtidos com este polioliol (SHABA *et al.*, 2018; SUKIRNO & FARHANDIKA, 2020; BILAL *et al.*, 2013). Vale ainda ressaltar a importancia ambiental deste trabalho, visto que o mesmo busca reaproveitar e gerar valor agregado a subprodutos, como é o caso do óleo de fritura, evitando assim o desperdício de insumos e reduzindo a geração de resíduos.

2.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLA R; SANNY AS; DERMAN E (2017) Stability studies of immobilized lipase on rice husk and eggshell membrane. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering, v. 206, n. 1.

ABED SM. *et al* (2018) Synthesis of structured lipids enriched with medium-chain fatty acids via solvent-free acidolysis of microbial oil catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase. *Lwt*, v. 93, p. 306–315.

AFIFAH NA; SYAHRULLAIL S; WANAZLEE NI *et al* (2019) Biolubricant production from palm stearin through enzymatic transesterification method. *BiochemEng J* 148:178–184.

AGUIEIRAS ÉCG; CAVALCANTI EDC; DA SILVA PR; SOARES VF; FERNANDEZ-LAFUENTE R; BESSA ASSUNÇÃO CL;... FREIRE D. M G (2019). Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials. *Renewable Energy*.

ALVES M; ARACRI F; CREN E; MENDES A (2016) Kinetic, thermodynamic, optimization and reusability studies for the enzymatic synthesis of a saturated wax ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.133, p.377-387.

ALVES M; ARACRI F; CREN E; MENDES A (2017) Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin. *Chemical Engineering Journal*, v.311, p.1-12.

ALVES SM; BARROS BS; TRAJANO MF *et al* (2013) Tribological behavior of vegetable oil-based lubricants with nanoparticles of oxides in boundary lubrication conditions. *Tribol Int* 65:28–36.

AMBAT I; SRIVASTAVA V; SILLANPAA M (2018) Recent advancement in biodiesel production methodologies using various feedstock: a review, *Renew. Sustain. Energy Rev.* v.90, p.356-369.

ANGAJALA G; PAVAN P; SUBASHINI R (2016) Lipases: an overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. *Biocatal Agric Biotechnol* 7:257–270.

ANGULO B; FRAILE JM; GIL L; HERRERÍAS CI (2020). Comparison of Chemical and Enzymatic Methods for the Transesterification of Waste Fish Oil Fatty Ethyl Esters with Different Alcohols. *ACS Omega*, v. 5, n. 3, p. 1479–1487.

ARAVIND A; PRABHAKARAN NAIR K; JOY ML (2018) Formulation of a novel biolubricant with enhanced properties using esterified rubber seed oil as a base stock. *Proc Inst MechEng Part J J Eng Tribol* .232:1514–1524.

ATTIA NK; EL-MEKKAWI AS; ELARDY AO; ABDELKADER EA (2020) Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. *Fuel* 271:117578.

BARBOSA MS; FREIRE CCC; ALMEIDA LC; FREITAS LS; SOUZA RL; PEREIRA EB;... SOARES CMF *et al* (2019). Optimization of the enzymatic hydrolysis of Moringa oleifera Lam oil using molecular docking analysis for fatty acid specificity. *Biotechnology and Applied Biochemistry*.

BARSÉ L Q *et al* (2019) Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 94, n. 2, p. 389–397.

BASHIR N; SOOD M; BANDRAL JD (2020) Enzyme immobilization and its applications in food processing: A review. *Int J Chem Stud*; 8(2): 254-261.

BASSO A; SERBAN S (2019) Industrial applications of immobilized enzymes—A review. *Molecular Catalysis*, v. 479, n. September, p. 110607.

BEDŐ Z; BÉLAFI-BAKÓ K; NEMESTÓTHY N; GUBICZA L (2019) Production of a biolubricant by enzymatic esterification: Possible synergism between ionic liquid and enzyme. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, v. 46, n. 2, p. 27–31.

BENTO H; DE CASTRO H; DE OLIVEIRA P; FREITAS L (2017). Magnetized poly(STY- co -DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v.426, p.95–101.

BEZERRA CS. *et al* (2015) Enzyme immobilization onto renewable polymeric matrixes: Past, present, and future trends. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 132, n. 26, p. 1–15.

BILAL S; MOHAMMED-DABO I; NUHU M; KASIM S; ALMUSTAPHA I; YAMUSA Y (2013) Production of bio-lubricant from *Jatropha curcas* seed oil. *Journal of Chemical Engineering and Materials Science*, v.4, p.72-79.

BILAL M; RASHEED T; ZHAO Y; IQBAL HMN; CUI J (2018) “Smart” chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials, *International Journal of Biological Macromolecules*, Volume 119, Pages 278-290, ISSN 0141-8130.

BIOCOLETA (2013) <http://www.biocoleta.com/novosite/impactos-ambientais-causados-pelo-oleo-usado-de-fritura/> Acessado 23 SET 2020.

BOLINA I ; GOMES R; MENDES A (2021) Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: Current Scenario and Future Perspectives. *BioEnergy Research*.

BOLINA I; SALVIANO A; TARDIOLI P; CREN E; MENDES A (2018) Preparation of ion-exchange supports via activation of epoxy-SiO₂ with glycine to immobilize microbial lipase – Use of biocatalysts in hydrolysis and esterification reactions. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.120, p. 2354–2365.

BRADFORD M (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254.

BRESSANI A; GARCIA K; HIRATA D; MENDES A (2015) Production of alkyl esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: optimization by response surface methodology. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, v.8, p.287-297.

CANTONE S; FERRARIO V; CORICI L *et al* (2013) Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. *Chem Soc Rev* 42:6262–6276.

CARDOZA GALDÁMEZ EV (2002) Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos.

CARTERET C; JACOBY J; BLIN JL (2018) Using factorial experimental design to optimize biocatalytic biodiesel production from *Mucormiehei* Lipase immobilized onto ordered mesoporous materials, *Microporous Mesoporous Mater.* 268,39–45.

CARVALHO NB; LIMA AS; SOARES CMF (2015) Use of modified silicas for lipase immobilization. *Química Nova Na Esc.* 38 399–409.

CARVALHO T; PEREIRA ADS; BONOMO RCF *et al* (2020) Simple physical adsorption technique to immobilize *Yarrowialipolytica* lipase purified by different methods on magnetic nanoparticles: Adsorption isotherms and thermodynamic approach, *International Journal of Biological Macromolecules*.

CAVALCANTI E; AGUIEIRAS É; SILVA P (2018) Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. *Fuel*, v. 215, p. 705–713.

CECILIA JÁ; PLATA DB; SABOYA RMA *et al* (2020) An overview of the biolubricant production process: challenges and future perspectives. *Processes* 8:1–24.

CERÓN A; VILAS BOAS R; BIAGGIO F; CASTRO H (2018) Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: Batch and continuous processes. *Biomass and Bioenergy*, v. 119, n. September, p. 166–172.

CHAN CH; TANG SW; MOHD NK *et al* (2018) Tribological behavior of biolubricant base stocks and additives. *Renew Sustain Energy Rev* 93:145–157.

CHANDRA P; ENESPA SINGH R. *et al* (2020) Microbial lipases and their industrial applications: a comprehensive review. *Microb Cell Fact* 19, 169 .

CHEN Z; WU, YP; FENG GL; QIAN ZH; SUN GQ. (2021). Effects of global warming on pattern dynamics of vegetation: Wuwei in China as a case. *Applied Mathematics and Computation*, 390, 125666.

CHUA SY; PERIASAMY L; GOH CMH; TAN YH; MUJAWAR MN; KANSEDO J; ... ABDULLAH EC (2019) Biodiesel Synthesis using Natural Solid Catalyst Derived from Biomass Waste – A Review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*.

CORRÊA W; BORTOLOZO AD; OSÓRIO W; DA SILVA PADILHA G (2021). Physical adsorption used to the immobilization of *Burkholderia cepacia* lipase into powder polymeric supports. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*.

COSTA MJ; SILVA MRL; FERREIRA EEA; CARVALHO AKF *et al* (2020). Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock. *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, 108131.

DA SILVA JAC; HABERT AC; FREIRE DMG (2013) A potential biodegradable lubricant from castor biodiesel esters. *LubrSci* 25:53–61.

DA SILVA JAC; SOARES VF; FERNANDEZ- LAFUENTE R *et al* (2015) Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. *J Mol Catal B Enzym* 122:323–329.

DARONCH NA; KELBERT M; SENNA CP; DE ARAÚJO PHH; DE OLIVEIRA D (2020). Elucidating the choice for a precise matrix for laccase immobilization: a review. *Chemical Engineering Journal*, 125506.

DE ANDRADES D; GRAEBIN NG; KADOWAKI MK; AYUB MAZ; FERNANDEZ-LAFUENTE R; RODRIGUES R C (2019). Immobilization and stabilization of different β -glucosidases using the glutaraldehyde chemistry: Optimal protocol depends on the enzyme. *International Journal of Biological Macromolecules*, 129, 672–678.

DE LACERDA JGP; CANDEIA RA; DE MORAIS SALES LL *et al* (2019) Characterization of biodiesel from frying oil obtained by hydroesterification using vermiculite as heterogeneous catalyst. *J Therm Anal Calorim* 137:2045–2052.

DE SOUZA TC; DE SOUSA TF; DE SOUSA JS; LIMA PJM; NETO CACG; MONTEIRO RRC;... GONÇALVES LRB (2020). Modulation of lipase B from *Candida Antarctica* properties via covalent immobilization on eco-friendly support for enzymatic kinetic resolution of rac-indanylacetate. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

DI PIETRO M; MANNU A; MELE A (2020) NMR determination of free acids in vegetable oils. *Processes*, 8, 410.

DORNI C; SHARMA P; SAIKIA G; LONGVAH T (2018) Fatty acid profile of edible oils and fats consumed in India. *Food Chemistry*, 238, 9–15.

FARUQUE M O; RAZZAK S A; HOSSAIN M M (2020). Application of Heterogeneous Catalysts for Biodiesel Production from Microalgal Oil —A Review. *Catalysts*, 10(9), 1025.

FATTAH IMR; ONG HC; MAHLIA TMI; MOFIJUR M; SILITONGA AS; RAHMAN SMA; AHMAD A (2020). State of the art of catalysts for biodiesel production. *Front. Energy Res*, 8, 101.

FENG D; LIU T; SU J; BOSCH M; WEI Z; WAN W; LIAN X (2015) Stable metal-organic frameworks containing single-molecule traps for enzyme encapsulation. *Nature communications*, v. 6, n. 1, p. 1-8.

FERNANDES KV; CAVALCANTI EDC; CIPOLATTI EP; AGUIEIRAS ECG; PINTO MCC; TAVARES FA;... FREIRE DMG. (2020). Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. *CatalysisToday*.

FERNANDES KV; PAPADAKI A; DA SILVA JAC *et al* (2018) Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. *Ind Crops Prod* 116: 90–96.

FERREIRA ARO; SILVESTRE-ALBERO J; MAIER ME *et al* (2020) Sulfonated activated carbons as potential catalysts for biolubricant synthesis. *Mol Catal* 488:110888.

FILHO DG; SILVA AG; GUIDINI CZ (2019) Lipases: sources, immobilization methods, and industrial applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 103:7399–7423.

GHAFFAR F; SAPAWE N; DZAZITAJEMAIN E *et al* (2019) Study on the potential of waste cockle Shell derived calcium oxide for biolubricant production. *Mater Today Proc* 19:1346–1353.

GHOLAMZADEH P; MOHAMMADI ZIARANI G; BADIEI A (2017) Immobilization of lipases onto the SBA-15 mesoporous silica. *Biocatal Biotransformation* 35:131–150

GIRELLI AM; ASTOLFI ML; SCUTO FR (2019). Agro-industrial wastes as potential carriers for enzyme immobilization: A review. *Chemosphere*, 125368.

Grand View Research I and its A Grand View Research, Inc. and its Affiliates. <https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/lubricants-market>. Accessed 25 Jan 2021

GRECO-DUARTE J; CAVALCANTI-OLIVEIRA E; SILVA J; FERNANDEZ-LAFUENTE R; FREIRE D (2017) Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. *Fuel*, v. 202, p. 196–205.

GRYGLEWICZ S (2000) Alkaline-earth metal compounds as alcoholysis catalysts for ester oils synthesis. *Appl Catal A Gen* 192:23–28.

GUIMARÃES JR; MIRANDA LP; FERNANDEZ-LAFUENTE R; TARDIOLI PW (2021) Immobilization of Eversa® Transform via CLEA Technology Converts It in a Suitable Biocatalyst for Biolubricant Production Using Waste Cooking Oil. *Molecules*. 26(1):193.

GUPTA J; AGARWAL M; DALAI AK (2020) An overview on the recent advancements of sustainable heterogeneous catalysts and prominent continuous reactor for biodiesel production. *J Ind Eng Chem* 88:58–77.

HO CK; MCAULEY KB; PEPPEY BA (2019) Biolubricants through renewable hydrocarbons: a perspective for new opportunities. *Renew Sustain Energy Rev* 113:109261.

HUSSEIN R; ATTIA N; FOUAD M; ELSHELTAWY S (2021). Experimental investigation and process simulation of biolubricant production from waste cooking oil. *Biomass and Bioenergy*, v.144, p.873-877.

IVAN-TAN CT; ISLAM A; YUNUS R; TAUFIQ-YAP YH (2017) Screening of solid base catalysts on palm oil based biolubricant synthesis. *J Clean Prod* 148:441–451.

JAVED S; AZEEM F; HUSSAIN S *et al* (2018) Bacterial lipases: a review on purification and characterization. *Prog Biophys Mol Biol* 132:23–34.

JEMLI S; AYADI-ZOUARI D; HLIMA H BEN; BEJAR S (2016) Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Crit Rev Biotechnol* 36:246–258.

JI X; SU Z; LIU C; WANG P; ZHANG S (2017) Regulation of enzyme activity and stability through positional interaction with polyurethane nanofibers. *Biochem. Eng. J.* 121, 147–155.

KARMAKAR G; GHOSH P; SHARMA BK (2017) Chemically Modifying Vegetable Oils to Prepare Green Lubricants. *Lubricants*, 5, 44.

KAUSHAL J; SINGH G; ARYA SK (2018) Immobilization of catalase onto chitosan and chitosan–bentonite complex: a comparative study. *Biotechnol. Rep.* 18.

KHAN MR (2021). Current and future role of immobilized enzymes in medical field. *Curr Med Drug Res*, 2021, 5 (1), Article ID 213.

KIM H; CHOI N; KIM Y (2019) Immobilized lipase-catalyzed esterification for synthesis of trimethylolpropane triester as a biolubricant. *Renewable Energy*, v. 130, p. 489–494, 2019.

KOKLUKAYA SZ; SEZER S; AKSOY S; HASIRCI N (2016) Polyacrylamide-based semi-interpenetrating networks for entrapment of laccase and their use in azo dye decolorization. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 63, 699–707.

KUMAR R & PAL P (2021). Lipase immobilized graphene oxide biocatalyst assisted enzymatic transesterification of *Pongamia pinnata* (Karanja) oil and downstream enrichment of biodiesel by solar-driven direct contact membrane distillation followed by ultrafiltration. *Fuel Processing Technology*, 211, 106577.

LAGE F; BASSI J; CORRADINI M (2016) Preparation of a biocatalyst via physical adsorption of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on hydrophobic support to catalyze biolubricant synthesis by esterification reaction in a solvent-free system. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 84, p. 56–67.

LINYUN LA; BINGNAN MB; WEI LA; HELAN XA; JING YA; YIQI YB (2021). Clean cotton dyeing in circulated dyebath of waste cooking oil: A feasible industrialization strategy for pollution minimization. *Journal of Cleaner Production* 278.

LIU J; MA RT; SHI YP (2019). “Recent advances on support materials for lipase immobilization and applicability as biocatalysts in inhibitors screening methods”- A Review. *Analytica Chimica Acta*.

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

MACHADO NB; MIGUEZ JP; BOLINA ICA; SALVIANO AB *et al* (2019) Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption, *Enzyme and Microbial Technology*, Volume 128, 9-21.

MADARÁSZ J; NÉMETH D; BAKOS J; GUBICZA L; BAKONYI P (2015) Solvent-free enzymatic process for biolubricant production in continuous microfluidic reactor. *Journal of Cleaner Production*, v. 93, p. 140–144.

MANOEL E A; DOS SANTOS J C S; FREIRE D M G *et al* (2015) Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme Microb Technol* 71:53–57.

MANSIR N; TEO S; RASHID U; SAIMAN M; TAN Y; ALSULTAN G; TAUFIQ-YAP Y (2018) Modified waste egg shell derived bifunctional catalyst for biodiesel production from high FFA waste cooking oil. A review. *Renew. Sustain. Energy Rev.*, v.82 , p.3645–3655.

MARTINS A; FRIEDRICH J; CAVALHEIRO J; GARCIA-GALAN C; BARBOSA O; AYUB M; RODRIGUES R (2013). Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads. *Bioresource Technology*, v.134, p.417–422.

MCNUTT J; HE QS (2016) Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. *J Ind Eng Chem* 36:1–12.

MIGUEZ JP; GAMA RS; BOLINA ICA *et al* (2018) Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared

via physical adsorption of lipase on aminofunctionalized rice husk silica. *Chem Eng Res Des* 139:296–308.

MOBARAK HM; NIZA MOHAMAD E; MASJUKI HH *et al* (2014) The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. *Renew Sustain Energy Rev* 33:34–43.

MOHAMAD N; CHE MARZUKI N; BUANG N; HUYOP F; WAHAB R (2015) An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* v.29,p.205–220.

MONTEIRO RRC; ARANA-PEÑA S; DA ROCHA TN; MIRANDA LP; BERENGUER-MURCIA Á; TARDIOLI PW;... FERNANDEZ-LAFUENTE R. (2020). Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? *Renewable Energy*.

MUKHERJEE J; GUPTA MN (2017) Protein aggregates: forms, functions and applications. *Int J Biol Macromol* 97:778–789.

MULINARI J; OLIVEIRA JV; HOTZA D (2020) Lipase immobilization on ceramic supports: An overview on techniques and materials. *Biotechnol Adv* 42:107581.

NADAR S & RATHOD V (2018) Magnetic-metal organic framework (magnetic-MOF): a novel platform for enzyme immobilization and nanozyme applications. *International journal of biological macromolecules*, v. 120, p. 2293-2302.

NAIR AR; CHELLAPAN G (2019). Improving operational stability of thermostable *Pythium myriotylum* secretory serine protease by preparation of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 1–9.

OH J; YANG S; KIM C *et al* (2013) Synthesis of biolubricants using sulfated zirconia catalysts. *Appl Catal A Gen* 455:164–171.

OKURA NS; SABI GJ; CRIVELLENTI MC; GOMES R; FERNANDEZ-LAFUENTE R; MENDES AA (2020) Improved immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus* on a new chitosan-based heterofunctional support: Mixed ion Exchange plus hydrophobic interactions, *International Journal of Biological Macromolecules*, Vol. 163, P.550-561.

ORTIZ C; FERREIRA ML; BARBOSA O *et al* (2019) Novozym 435: The “perfect” lipase immobilized biocatalyst? *CatalSciTechnol* 9:2380–2420.

PADILHA GS; TAMBOURGI EB; ALEGRE RM (2018) Evaluation of lipase from *Burkholderia cepacia* immobilized in alginate bead sand application in the synthesis of banana flavor (isoamylacetate). *Chem. Eng. Commun.* 205, 23–33.

PANCHAL TM; PATEL A; CHAUHAN DD *et al* (2017) A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. *Renew Sustain Energy Rev* 70:65–70.

PAPADAKI A; FERNANDES KV; CHATZIFRAGKOU A; AGUIEIRAS ECG; DA SILVA JAC; FERNANDEZ-LAFUENTE R;... FREIRE DMG (2018). Bioprocess development for biolubricant production using microbial oil derived via fermentation from confectionery industry wastes. *Bioresource Technology*, 267, 311–318.

POPPE JK; FERNANDEZ-LAFUENTE R; RODRIGUES RC; AYUB MAS (2015) Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects. *Biotechnol Adv* 33:511–525.

POURZOLFAGHAR H; ABNISA F; DAUD WMA; AROUA MK (2016). A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 61, 245–257.

QUAYSON E; AMOAH J; HAMA S; KONDO A; OGINO C (2020). Immobilized lipases for biodiesel production: Current and future greening opportunities. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 134, 110355.

REEVES CJ; SIDDAIAH A; MENEZES PL (2017) A review on the science and technology of natural and synthetic biolubricants. *J Bio- Tribo-Corrosion* 3:1–27.

REIS CLB; DE SOUSA EYA; DE FRANÇA SJ *et al* (2019) Design of immobilized enzyme biocatalysts: Drawbacks and opportunities. *Quim Nova* 42:768–783.

REN S; JIANG S; YAN X; CHEN R; CUI H (2020). Challenges and Opportunities: Porous Supports in Carbonic Anhydrase Immobilization. *Journal of CO2 Utilization*, 42, 101305.

RIOS ÍC; CORDEIRO JP; ARRUDA TBMG *et al* (2020) Chemical modification of castor oil fatty acids (*Ricinus communis*) for biolubricant applications: An alternative for Brazil's greenmarket. *Ind Crops Prod* 145:112000.

RODRIGUES R; HERNANDEZ K; BARBOSA O; RUEDA N; GARCIA-GALAN C; DOS SANTOS J; BERENQUER-MURCIA A; FERNANDEZ-LAFUENTE R (2015) Immobilization of Proteins in Poly-Styrene-Divinylbenzene Matrices: Functional Properties and Applications. *Current Organic Chemistry*, v.19, p.1707-1718.

RODRIGUES RC; VIRGEN-ORTÍZ JJ; DOS SANTOS JCS *et al* (2019) Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. *Biotechnol Adv* 37:746–770.

ROSSET D; WANCURA J; UGALDE G (2019) Enzyme-catalyzed production of FAME by hydroesterification of soybean oil using the novel soluble lipase NS40116. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, p. 1–13.

SABOYA RMA; CECILIA JA; GARCÍA-SANCHO C *et al* (2016) WO₃-based catalystssupportedonporousclayheterostructures (PCH) with Si-Zr pillars for syntheticestersproduction. *Appl Clay Sci.*124–125:69–78.

SABOYA RMA; CECILIA JA; GARCÍA-SANCHO C *et al* (2017a) Synthesis of biolubricants by the esterification of free fatty acids from castor oil with branched alcohols using cationic exchange resins as catalysts. *Ind Crops Prod* 104:52–61.

SABOYA RMA; CECILIA JA; GARCÍA-SANCHO C *et al* (2017b) Assessment of commercial resins in the biolubricants production from free fatty acids of castor oil. *Catal Today* 279:274–285.

SANNIA S; MOSES; EMETEREB E; EFEOVBOKHANA V; UDONNE J (2017) Process Optimization of the Transesterification Processes of Palm Kernel and Soybean Oils for Lube Oil Synthesis. *International Journal of Applied Engineering Research*, v.14, p.4113-4129.

SANTOS JCSD; BARBOSA O; ORTIZ C *et al* (2015) Importance of the support properties for immobilization or purification of enzymes. *ChemCatChem* 7:2413–2432.

SANTOS S; PUNA J; GOMES J (2020). A Review on Bio-Based Catalysts (Immobilized Enzymes) Used for Biodiesel Production. *Energies*, 13(11), 3013.

SARNO M; IULIANO M; CIRILLO C (2019) Optimized procedure for the preparation of an enzymatic nanocatalyst to produce a biolubricant from waste cooking oil. *Chem Eng J* 377:120273.

SASTRE DE; REIS EA; MARQUES NETTO CGC (2019). Strategies to rationalize enzyme immobilization procedures. *Methods in Enzymology*.

SHABA M; MOHAMMED A; MUSA D; AUDU B; KATAMBA Y (2018) Synthesis and Optimization Process of Ethylene Glycol-Based Bio-lubricant from Palm Kernel Oil (PKO). *Journal of Renewable Energy and Environment*, v.5, p.1-9.

SHELDON RA (2019) CLEAs, combi-CLEA sand 'smart' magnetic CLEAs: biocatalysis in a bio-based economy. *Catalysts* 9:1–31.

SHUAI W; DAS RK; NAGHDI M *et al* (2017) A review on the important aspects of lipase immobilization on nanomaterials. *Biotechnol Appl Biochem* 64:496–508.

SIGURDARDÓTTIR SB; LEHMANN J; OVTAR S; GRIVEL JC.; NEGRA MD; KAISER A; PINELO M (2018) Enzyme immobilization on inorganic surfaces for membrane reactor applications: mass transfer challenges, enzyme leakage and reuse of materials. *Adv. Synth. Catal.* 360, 2578–2607

SINGH R; KUMAR M; MITTAL A; MEHTA P (2016) Microbial enzymes: industrial progress in 21st century, 3 *Biotech* , v.6 ,p.174 .

SINGH Y; SHARMA A; SINGLA A (2019) Non-edible vegetable oil-based feedstocks capable of bio-lubricant production for automotive sector applications—a review. *Environ Sci Pollut Res* 26:14867–14882.

SONG D; ZHANG P; SUN Y; ZHANG Q; GUO Y (2019) Design of periodic mesoporous sulfonic acid and titanium bi-functionalized alkyl-bridged organosilica hybrid catalysts for efficient synthesis of ethyl levulinate. *Microporous and Mesoporous Materials*, v.279 , p.352–363.

SOUZA L; VERISSIMO L; JOÃO B; SANTORO M; RESENDE R; MENDES A (2017) Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*.v. 4 ,p.529-568.

STATISTA (2020) Market volume of lubricants worldwide in 2019, by leading country. <https://www.statista.com/statistics/821076/lubricants-global-market-volume-by-country/>. Accessed 25 JAN 2021

SUBROTO E; QONIT M (2020) Modification of soy protein for the production of bioactive peptides and their utilization, *Int. J. Sci. Technol. Res.*, vol. 9, no. 2, pp. 3121–3127.

SUBROTO E; PANGAWIKAN A; YARLINA V; ISNAENI N (2020) Characteristics, Purification, and the Recent Applications of Soybean Oil in Fat-Based Food Products: A Review. *International Journal*, 8(7).

SUKIRNO ; FARHANDIKA L (2020). Synthesis and characterization of ethylene glycol ester from spent bleaching earth oil and ethylene glycol as hydraulic lubricants. *International Conference On Trends In Material Science And Inventive Materials*,v.2255, p.1-6.

SYAHIR A; ZULKIFLI N; MASJUKI H; KALAM M; ALABDULKAREM A; GULZAR G; KHUONG L; HARITH M (2017) A review on bio-based lubricants and their applications. *Journal of Cleaner Production*, v.168, p.997-1016.

TAN Y H; ABDULLAH MO; KANSEDO J; MUBARAK N M; CHAN YS; NOLASCO HIPOLITO C (2019). Biodiesel production from used cooking oil using Green solid catalyst derived from calcined fusion waste chicken and fishbones. *Renew. Energ.* 139, 696–706.

THANGARAJ B; JIA Z; DAI L *et al* (2019) Effect of silica coating on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for lipase immobilization and their application for biodiesel production. *Arab J Chem* 12:4694–4706.

THANGARAJ B ; SOLOMON P (2019). Immobilization of Lipases – A Review. Part II: Carrier Materials. *ChemBioEng Reviews*.

TODERO LM; BASSI JJ; LAGE FAP *et al* (2015) Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 1601–1613 .

VERMA ML; KUMAR S; DAS A *et al* (2019) Chitin and chitosan based support materials for enzyme immobilization and biotechnological applications. *Environ Chem Lett* 18:315–323.

WANCURA JHC; ROSSET DV; MAZUTTI MA; UGALDE GA; DE OLIVEIRA JV *et al* (2019). Improving the soluble lipase–catalyzed biodiesel production through a two-step hydroesterification reaction system. *Applied Microbiology and Biotechnology*.

WANG Y ; CARUSO F (2005). Mesoporous Silica Spheres as Supports for Enzyme Immobilization and Encapsulation. *Chemistry of Materials*, 17(5), 953–961.

XIE W ; WANG H (2020) Immobilized polymeric sulfonated ionic liquid on core-shell structured Fe₃O₄/SiO₂ composites: A magnetically recyclable catalyst for simultaneous transesterification and esterifications of low-cost oils to biodiesel. *Renewable Energy*, v.45 ,p.1709-1719.

XU H; FAN T; YE N; WU W; HUANG D; WANG D; ZHANG L (2020) Plasticization Effect of Bio-Based Plasticizers from Soybean Oil for Tire Tread Rubber. *Polymers*, 12(3), 623.

YAO L; HAMMOND E ; WANG T; BU W; VAKNIN D (2014). Physical and monolayer film properties of potential fatty ester biolubricants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v.116.

YOSHIDA S; MATSUSHIMA K; JOBOJI T (2021) Direct Synthesis of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) from Cellulose using Saturated Steam. *MATEC Web Conf.* 333 05007 (2021)

ZAINAL NA; ZULKIFLI NWM; GULZAR M; MASJUKI HH (2018) A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. *Renew Sustain Energy Rev* 82:80–102.

ZDARTA J; MEYER AS; PINELO M (2018) Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: a comprehensive review, *Adv. Colloid Interface Sci.* 258 (2018) 1–20.

ZHANG W; JI H; SONG Y; MA S; XIONG W; CHEN C; ZHANG X (2020a). Green preparation of branched biolubricant by chemically modifying waste cooking oil with lipase and ionic liquid. *Journal of Cleaner Production*, 122918.

ZHANG Y; NIU S; LU C; GONG Z; HU X (2020b). Catalytic performance of NaAlO₂/γ-Al₂O₃ as heterogeneous nanocatalyst for biodiesel production: optimization using response surface methodology. *Energy Convers. Manage.* 203:112263.

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

ZHAO Z; ZHOUMC; LIU RL (2019) Recent developments in carriers and non-aqueous solvents for enzyme immobilization. *Catalysts* 9:1–15.

ZHENG D; WANG S; QIU S *et al* (2018) Synthesis of butyl oleate catalyzed by cross-linked enzyme aggregates with magnetic nanoparticles in rotating magneto-micro-reactor. *J Biotechnol* 281:123–129.

ZHONG L; FENG Y; WANG G *et al* (2020) Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: a review from the waste to biodiesel production. *Int J Biol Macro mol* 152:207–222.

ZUCCA P; SANJUST E (2014) Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms. *Molecules*, v.19, p.14139–14194.

3. ARTIGO: Design of a sustainable process for enzymatic production of ethylene glycol diesters from used soybean cooking oil

Abstract

This study aimed to produce glycol diesters via hydroesterification of used soybean cooking oil (USCO). Initially, there was free fatty acid (FFA) production through hydrolysis and then they were catalyzed using powder lipase extract from *Candida rugosa*. Afterwards, glycols and produced FFAs were esterified using open reactors to eliminate water molecules. For such a purpose, a low-cost liquid lipase from *Thermomyces lanuginosus* (Eversa[®] Transform 2.0) immobilized via interfacial activation on polystyrene-divinylbenzene (PSty-DVB) beads was used as heterogeneous biocatalyst. The prepared biocatalyst exhibited the highest catalytic activity using ethylene glycol (EG), therefore it was selected for further ester production optimization. The effect of relevant factors on EG diester production were assessed through the central composite rotatable design (CCRD). As a result, full OH conversion (100%) was achieved at 65 °C in a EG:FFA molar ratio of 1:3 and biocatalyst concentration of 18% m/m at 40 min of reaction. Maximum OH conversion was only 32.5% using crude lipase extract under such conditions. The biocatalyst retained ≈37% of its original activity after seven successive esterification batches. Physical properties of produced EG diesters were similar to other EG esters produced from soybean oil in literature and commercial synthetic neopolyol esters.

Keywords: Glycol diesters, Biolubricants, Enzymatic hydroesterification, Used soybean cooking oil, Physical properties.

1. Introduction

Lubricants are organic compounds responsible for reducing friction and stress between two or more surfaces in mutual contact, which are also used for preventing corrosion, heating or cooling surfaces, removing dirt particles or combustion residues from filters, sealing at critical points, delivering additives to materials and transferring forces in power steering systems [1–3]. The global lubricant market reached \$125.81 billion in 2020 and its production is expected to grow at an annual rate of 3.7% from 2021 to 2028 [4]. Conventional lubricants are petroleum-based products able to harm the environment as they pose problems associated with proper disposal [2,3,5,6]. In the latest years, there has been a growing demand for environmentally friendly products, thus there is ample room for improvement of a large variety of biolubricants due to their low toxicity and biodegradability, and excellent physicochemical properties such as good contact lubrication, high viscosity index, high flash point and low volatility [3,5]. For such purpose, several edible and non-edible oleaginous feedstocks have been used for their production, such as vegetable oils, microbial oils, animal fats or waste oils [2,3,5–7].

The global edible vegetable oils consumption reached around 210 million metric tons in 2020/2021 [8], which in turn has led to the generation of large amounts used soybean cooking oils – WCO) by the largest producing countries [9]. A rampant disposal of waste oils has caused serious environmental, economic and social problems [10,11]. In this context, recent technological advances have been proposed to convert them into valuable products to be used by oleochemical industries due to offering environmental benefits that lead to a significant reduction in production costs [10–14].

The direct use of these oleaginous feedstocks as biolubricants is inappropriate due to their low oxidative and hydrolytic stabilities and poor performance at cold temperatures [3,6]. In order to overcome such undesirable aspects, several chemical modification methods have been successfully proposed, such as transesterification, hydroesterification, epoxidation and ring opening [2,5,7]. These methods are preferentially performed using several homogeneous or heterogeneous catalysts, such as acidic or alkaline chemical catalysts and enzymes – lipases [3,6,7]. The enzymatic route using lipases is a sustainable and eco-friendly process for biolubricant production, since it requires mild reaction conditions and generates fewer by-products due to their high selectivity, moreover, its low-cost oleaginous feedstocks containing water and FFAs from non-edible and waste oils, e.g. waste cooking oils, can be successfully used as raw materials [7,15,16].

A recent study about enzymatic production of biolubricants has evidenced that researchers worldwide have been devoting their efforts on using immobilized lipases preferably as catalysts [7]. Their use in industrial processes allows ease of reuse in a bioreactor system, reduced operational costs, improved stability against temperature, organic solvents or mechanical stress, and broad flexibility of reactor configurations – batch or continuous processes [17,18]. In addition, immobilization techniques, if properly performed, can also improve the catalytic activity of lipases and reduce inhibitory effects [17,19–23]. Lipases have been immobilized via several techniques such as physical adsorption, entrapment, covalent attachment and cross-linked enzyme aggregates – CLEAs [17,24,25]. The most popular immobilization technique is the physical adsorption of lipases on hydrophobic supports at low ionic strength – mechanism known as interfacial

activation [19,26–29]. Some lipases have a polypeptide chain (named lid or flap) that covers their active sites and blocks their substrate accessibility – “closed form”. The presence of a hydrophobic surface such as hydrophobic supports or droplets of oils shifts the lid and a large hydrophobic pocket containing their active sites is exposed to the medium – “open form” [30–32].

Therefore, the present study aims to develop a sustainable and environmentally friendly process of enzymatic production of glycol esters through hydroesterification of a low-cost and non-edible oil – used soybean cooking oil (USCO) (SWCO). It consisted in sequential enzymatic hydrolysis to produce FFAs and esterification of the FFAs produced from USCO using glycols via sustainable and safe processes (solvent-free systems) [33,34]. The initial step was performed using a non-specific lipase from *Candida rugosa* (CRL) to hydrolyze all ester bonds of waste cooking oil into FFAs and glycerol [35,36]. The second step consisted in the esterification of produced FFAs with glycols catalyzed by a commercial lipase (Eversa® Transform 2.0) obtained through immobilization via interfacial activation on PSty-DVB beads. Eversa® Transform 2.0 is a liquid enzyme formulation launched on the market in 2016 by Novozymes S.A. [37]. This lipase is appropriately designed for industrial biodiesel production from several oils, including waste oils, due to its high catalytic activity and thermal stability, in addition to its lower cost (\$ 20.0 a Kg) if compared to other commercial lipases [37–39]. However, its use as biocatalyst for biolubricants production has not been extensively reported in literature yet [40]. It was also performed a literature search so as to confirm that this is the first study on glycol ester production using immobilized Eversa® Transform 2.0 as catalyst.

Since esterification is a thermodynamically controlled process [41], adding excess of starting materials and/or removing water molecules generated in the reaction is required to shift reaction equilibrium towards ester production [42–44]. In fact, esterification reactions were performed in open reactors to eliminate water molecules generated from the reaction mixture using a very simple strategy – evaporation at atmospheric pressure. The use of hydrophobic supports can also minimize the formation of an aqueous phase in a biocatalyst microenvironment [45,46]. Thence, it was opted to use PSty-DVB as hydrophobic support for this study. Moreover, it has high surface area and large pores which allows immobilize of large amounts of lipase [27,47,48].

The prepared heterogeneous biocatalyst was used to catalyze the esterification of the FFAs produced using four different glycols – ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), diethylene glycol (DEG) and neopentyl glycol (NPG). The immobilized lipase underwent initial tests in order to identify the glycol exhibiting the highest catalytic activity. Afterwards, the effect of relevant factors on the esterification reaction were evaluated using a central composite rotatable design (CCRD), i.e. a statistical tool extensively used for optimizing enzymatic production of industrial esters, including biolubricants [22,48–52]. The effect of contact time on diesters production was also studied so as to determine the reaction time required to achieve maximum conversion. Under optimal conditions, there were operational stability tests after several esterification batches. The physical properties of produced diesters were in accordance with standard methods.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Lipase from *Thermomyces lanuginosus* – Eversa[®] Transform 2.0 (hydrolytic activity of $\approx 20,000$ units/mL and protein concentration of 35.8 mg/mL) and *Candida rugosa* – CRL (hydrolytic activity of $\approx 16,000$ units/g and protein concentration of 24.5 mg/g) were acquired from Novozymes S.A. (Araucária, PR, Brazil) and Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), respectively. Used soybean cooking oil (USCO) was collected after being used once for French fries preparation in a restaurant at the Federal University of Alfenas (Alfenas, MG, Brazil). Its fatty acid composition (% m/m) is as follows: 10.7% palmitic, 3.0% stearic, 24.0% oleic, 56.7% linoleic, 5.4% linolenic and 0.1% arachidic acids [53], and its average molecular mass is 278.6 g/mol. Neopentyl glycol (NPG) was acquired from Sigma-Aldrich Co. Ethylene glycol (EG) was purchased from Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, SP, Brazil). Diethylene glycol (DEG) and propylene glycol (PG) were acquired from Isofar Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda (Duque de Caxias, RJ, Brazil). All other chemical reagents and organic solvents were of analytical grade and acquired from Synth[®] Ltd.

2.2. Immobilization of Eversa[®] Transform 2.0 via interfacial activation

Eversa[®] Transform 2.0 was immobilized on PSty-DVB beads at low ionic strength in accordance with previous studies [28,29,47,54]. An enzyme solution was prepared by mixing 1.12 mL crude lipase extract with 17.9 mL of 5 mM sodium acetate buffer at pH 5.0. The prepared solution was placed into 100 mL closed glass flasks and 1 g of wetted PSty-DVB beads [47] was added using a

fixed protein loading of 40 mg/g of support [29,54]. The suspension was stirred at 200 rpm in a thermostatic water bath at 25 °C. After 18 h of contact, the heterogeneous biocatalyst was filtered using a Buchner funnel under vacuum, which was then washed with distilled water and stored at 4 °C for 24 h before use. Immobilized protein concentration of 36 mg/g of support in equilibrium was determined according to Bradford`s method [55].

2.3. General procedure of enzymatic ester production via hydroesterification

It was used a two-step process (hydroesterification) herein in order to produce glycol diesters through FFA production from USCO hydrolysis, which was in turn catalyzed by CRL and FFA esterification using glycols in solvent-free systems using immobilized Eversa® Transform 2.0 as heterogeneous biocatalyst.

The hydrolysis step occurred in batch mode using a closed 350 mL-plastic flask immersed in thermostatic water bath. The reaction system consists of a mixture of USCO:water at 40% m/m which was stirred using a mechanical agitator equipped with a three-blade-helix impeller made of 2 mm thick stainless steel sheet with 6 cm in diameter. Experimental conditions for a full hydrolysis were set as follows: 40 °C, 3.2 g/L of CRL, at 1500 rpm of stirring frequency and 3 h of contact time. Afterwards, the mixture was transferred to a separation funnel, the aqueous phase (bottom layer) was separated by decantation and the FFA phase (upper layer) was washed threefold with distilled water. Finally, 20% m/v anhydrous sodium sulfate that had been previously dried in a muffle furnace at 250 °C for 4 h was added to the produced FFA and kept overnight under static conditions at 25 °C so as to remove water traces.

The second step involved esterification of FFAs produced from USCO and glycols in solvent-free systems using 100 mL open glass bottles (height of 10 cm and external diameter of ≈ 5.5 cm) containing 6 g of reaction mixture. As follows, there was an addition of the prepared heterogeneous biocatalyst to reaction mixtures, and then were immersed in a thermostatic water bath at fixed mechanical stirring (240 rpm). Samples (0.1 mL) were periodically collected from the reaction mixture, diluted in 10 ml of ethanol solution at 70% (m/m), and titrated with a 40 mM NaOH solution using phenolphthalein as pH indicator so as to determine the reaction progress in terms of OH conversion percentage (Y), as shown in Eq. (1) [34]. Control runs were performed by adding PSty-DVB beads to reaction mixtures, and there was no FFA consumption under such experimental conditions. In this study, all runs were performed in duplicate. Experimental data were analyzed using the software OriginPro version 5.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA).

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

where: FFA_0 and FFA_t are initial and residual FFA concentrations, respectively, at a given time t of reaction (mol/L), MR is the EG:FFA molar ratio and OH is the number of hydroxyl groups in glycol structures (2).

2.3.1. Effect of glycol type on esters production

The effect of glycol type on the esterification reaction using immobilized Eversa[®] Transform 2.0 as heterogeneous biocatalyst was initially evaluated. Reactions were conducted at 50 °C under continuous mechanical stirring at 240 rpm and biocatalyst concentration of 10% m/m (or 3.6 mg of immobilized protein/g

of reaction mixture) in a stoichiometric glycol:FFA molar ratio of 1:2. Such configuration corresponds to a) 0.6 g EG (9.7 mmol) + 5.4 g FFA (19.4 mmol); b) 0.72 g PG (9.5 mmol) + 5.25 g FFA (19.0 mmol); c) 0.94 g of NPG (9.1 mmol) + 5.06 g FFA (18.2 mmol); and d) 0.96 g DEG (9.0 mmol) + 5.04 g FFA (18 mmol).

2.3.2. Reaction optimization using the CCRD

A central composed rotatable design (CCRD) was used to assess the effect of three independent variables on esterification reactions using the selected glycol (ethylene glycol – EG). Selected variables were biocatalyst concentration (5–25% m/m), reaction temperature (20–70 °C), and EG:FFA molar ratio (1:1 to 1:4). The levels of each independent variable were established in preliminary runs (data not shown). The dependent variable (response) was OH conversion percentage. The proposed experimental design consisted of eight factorial runs (coded factor levels: –1 and +1) with six central points (coded factor level: 0) and six axial points (coded factor levels: –1.68 and +1.68), totaling twenty runs. In this set of experiments, reactions were performed under fixed experimental conditions: 6 g of reaction mixture, 240 rpm of mechanical stirring frequency and 30 min contact time.

The obtained experimental data were analyzed at 95% confidence level using the software Statistica 5.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) to develop three-dimensional (3D) surfaces, and the quadratic model was applied for calculating the mathematical relationships between independent and dependent variables, as shown in Eq. (2):

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

where Y is the predicted OH conversion percentage; n is the number of factors, x_i and x_j are the coded independent variables; a_0 , a_i , a_{ii} , and a_{ij} are the regression coefficients of intercept, linear, quadratic, and interaction terms, respectively; i and j are the index numbers for each variable; and e is the error identified by the proposed model.

In this study, the significance of regression coefficients was determined using Student's t -test. The statistical significance of the designed quadratic model (Eq. (2)) was analyzed by Fisher's F -test. The analysis of variance (ANOVA) and determination coefficient (R^2) were used to evaluate the proposed model fitting. Contour plots and 3D response surfaces were plotted and used to determine optimal experimental conditions for model validation by performing esterification reactions under such conditions. These experimental data were compared to theoretical values predicted by the developed model, as in Eq. (2).

2.7. Effect of contact time on EG esters production

The effect of contact time on an enzymatic production of EG esters was assessed under optimal experimental conditions previously determined by the response surface methodology. Such conditions were esterification reactions in open glass reactors at 65 °C, mechanical stirring frequency of 240 rpm, EG:FFA molar ratio of 1:3 (0.41 g EG – 6.6 mmol + 5.59 g FFA – 19.8 mmol) and biocatalyst concentration of 18% m/m (or 6.48 mg of immobilized protein/g of reaction mixture). In this set of experiments, there was also an esterification reaction using free lipase (liquid enzymatic extract) under such conditions using the same protein loading (1.1 mL of crude enzymatic extract that corresponds to 6.48 mg of soluble protein/g of reaction mixture).

2.7. Operational stability tests

These tests were conducted in open glass reactors containing 6 g of reaction mixture under optimal esterification conditions, i.e. 65 °C, mechanical stirring frequency of 240 rpm, EG:FFA molar ratio of 1:3, biocatalyst concentration of 18% m/m and 40 min of contact time. At the end of each esterification batch, the prepared heterogeneous biocatalyst was recovered from the reaction mixture via filtration using a Buchner funnel under vacuum, then washed with cold hexane to remove any starting material molecules retained in the biocatalyst microenvironment and stored overnight in a freezer at 4 °C under static conditions so as to remove water traces. The recovered biocatalyst was resuspended in a fresh reaction mixture in order to start a new reaction cycle. OH conversion percentage (Y) was determined at the end of each batch according to Eq. (1).

2.8. Esters separation procedure

The biocatalyst was removed from the reaction mixture via filtration using a Buchner funnel under vacuum. The produced esters were separated from the residual FFA in a glass column (5.2 × 28 cm) packed with activated silica gel (60 – 120 mesh) using hexane:ethyl acetate in different polarity gradients (9:1, 8:2, 7:3, and 1:1 v/v) as eluent. The fractions of esters were collected and organic solvents were evaporated using a rotary evaporator under vacuum at 50 °C. Afterwards, 20% m/v anhydrous sodium sulfate dried in a muffle furnace at 250 °C for 24 h was added to the separated EG esters and kept overnight under static conditions at 25 °C so as to remove water traces.

2.9. NMR analysis

^1H NMR (300 MHz) spectra were recorded using a Bruker AC 300 equipment (Bruker BioSpin, Germany). In this study, samples from the reaction mixture conducted under optimal experimental conditions were collected at different times (0, 10, 20 and 40 min). These samples (ca. 30 mg each) were dissolved in deuterated chloroform and transferred to 5 mm NMR tubes. Tetramethylsilane was used as internal standard. Residual starting materials and products (esters) were identified by interpreting specific signals for hydrogen atoms in their chemical structures.

2.10. EG esters characterization

Physical properties of EG esters were determined based on the American Society for Testing and Materials (ASTM) standard methods. Kinematic viscosities at 40 °C and 100 °C were determined using a LVDV-II cone and plate spindle Brookfield viscometer (Brookfield Viscosimeters Ltd., Harlow, UK) according to ASTM D445. Viscosity index was determined by taking into account kinematic viscosity values at 40 °C and 100 °C in accordance with ASTM D2270. Density at 20 °C was determined in accordance with ASTM D7022. Pour point was measured based on ASTM D97 method.

Results and discussion

3.1. Effect of alcohol type on enzymatic glycol ester production

In this study, four different glycols, i.e. ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), diethylene glycol (DEG) and neopentyl glycol (NPG), were used as reactants for ester production via esterification to generate FFAs using immobilized Eversa[®] Transform 2.0 as heterogeneous biocatalyst. A representative scheme of the enzymatic production of different glycol esters is shown in Fig. 1.

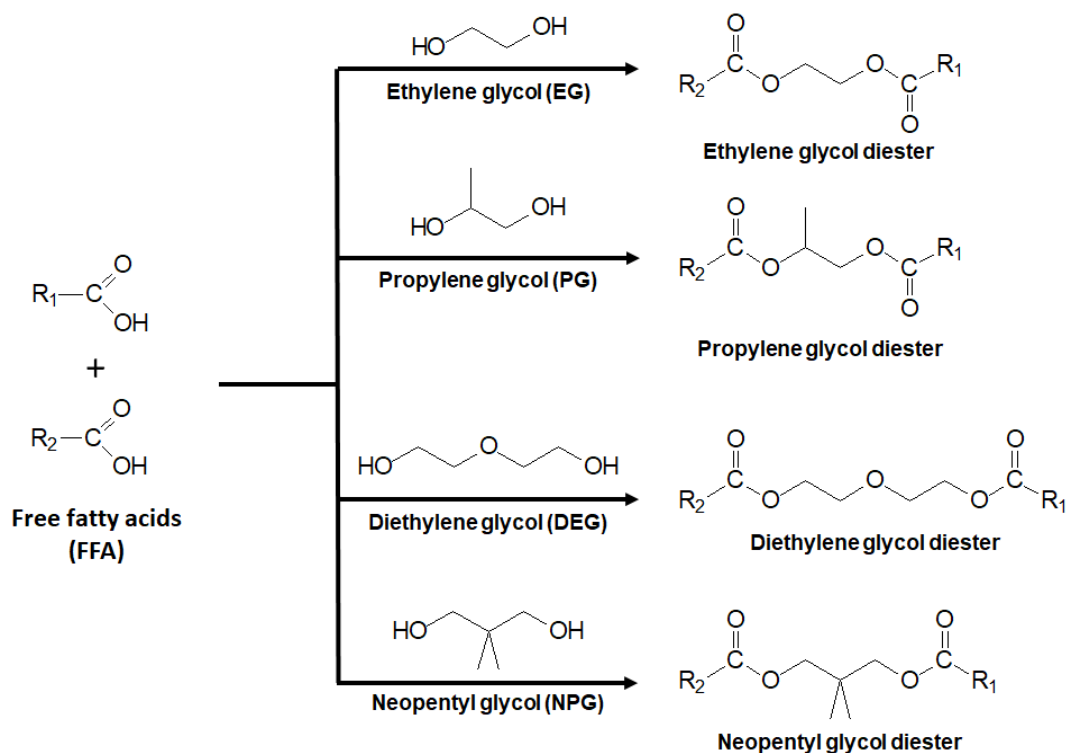


Figure 1- Representative scheme of the enzymatic production of the different glycol esters via esterification.

The effect of reaction time on glycol ester production is displayed in Fig.

2.

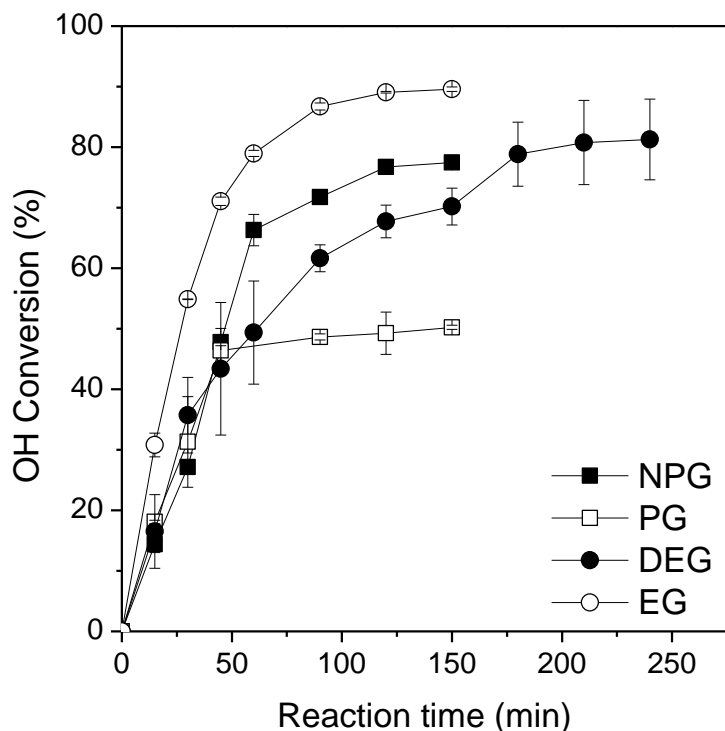


Figure 2- Effect of reaction time on the esterification of different glycols with FFA from USCO in solvent-free systems catalyzed by Eversa® Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB beads. The reactions were performed using a stoichiometric glycol:FFA molar ratio (1:2), 40°C, 240 rpm and biocatalyst concentration of 10% m/m.

A linear profile of OH consumption for all reaction systems during the initial 45 min of reaction was observed (4 trial points). After this period, different reaction courses can be observed due to possible different product inhibition profiles on the three dimensional structure of the enzyme and/or rheological properties of each reaction mixture that could have influenced the access of starting materials and intermediate product (glycol monoesters) molecules to their active sites. For the reaction performed using PG as glycol, there was 45% OH conversion at 45 min of reaction and maximum OH conversion of only 49% was attained at 90 min of reaction. Similar OH conversion percentage of 77–79% was achieved for ester production using NPG and DEG, although equilibrium was only reached at 120 and 180 min of reaction, respectively. Maximum OH conversion of 87% at 90 min of reaction was achieved using EG. Thus, further

tests for optimizing enzymatic ester production using statistical tools were performed with EG.

3.2. Optimization of enzymatic production of EG esters from USCO

To optimize enzymatic EG ester production, the effect of three relevant parameters, i.e. heterogeneous biocatalyst concentration (B), reaction temperature (T) and EG:FFA molar ratio (M), was evaluated using a full factorial CCD. Coded and actual values of parameters and the response variable (OH conversion percentage) of 20 runs are shown in Table 1. Results reveal that experimental OH conversion percentage values ranged from 28.6 (run #1) to 97.3% (run #8) at 30 min of reaction. These values were very close to predicted values, which indicates that the proposed model is fit for describing this enzymatic process.

Table 1- CCRD matrix for the analysis of the effect of independent variables on the enzymatic production of EG esters.

Runs	Independent variables			OH conversion	
	Coded (actual)			(%)	
	Biocatalyst (% m/m)	Reaction temperature (°C)	EG:FFA molar ratio	Experimental	Predicted ^a
1	-1 (9)	-1 (30)	-1 (1:1.6)	28.6	27.9
2	+1 (21)	-1 (30)	-1 (1:1.6)	40.3	44.9
3	-1 (9)	+1 (60)	-1 (1:1.6)	46.5	48.6
4	+1 (21)	+1 (60)	-1 (1:1.6)	63.6	65.5
5	-1 (9)	-1 (30)	+1 (1:3.4)	64.7	60.9
6	+1 (21)	-1 (30)	+1 (1:3.4)	74.8	77.8
7	-1 (9)	+1 (60)	+1 (1:3.4)	89.0	81.5
8	+1 (21)	+1 (60)	+1 (1:3.4)	97.3	98.5
9	-1.68 (5)	0 (45)	0 (1:2.5)	37.5	43.3
10	+1.68 (25)	0 (45)	0 (1:2.5)	78.4	71.9
11	0 (15)	-1.68 (20)	0 (1:2.5)	62.6	57.6
12	0 (15)	+1.68 (70)	0 (1:2.5)	94.2	92.4
13	0 (15)	0 (45)	-1.68 (1:1)	35.5	31.0
14	0 (15)	0 (45)	+1.68 (1:4)	81.9	86.4
15	0 (15)	0 (45)	0 (1:2.5)	77.8	75.0
16	0 (15)	0 (45)	0 (1:2.5)	73.8	75.0
17	0 (15)	0 (45)	0 (1:2.5)	68.6	75.0
18	0 (15)	0 (45)	0 (1:2.5)	67.1	75.0
19	0 (15)	0 (45)	0 (1:2.5)	78.2	75.0
20	0 (15)	0 (45)	0 (1:2.5)	77.6	75.0

^a values calculated according to Eq. (3).

The effect of parameters and their interactions on the response variable were found by Student's *t*-test, as shown in Table 2.

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

Parameters	Regression coefficients	Standard errors	p-values
Mean	74.97	± 1.82	0.000000
M	16.46	± 1.42	0.000000
M ²	-5.78	± 1.37	0.000888
T	10.33	± 1.42	0.000004
B	8.49	± 1.42	0.000034
B ²	-6.04	± 1.37	0.000612

ANOVA				
Source of variation	Sum of squares	Degree of freedom	Mean square	F-test
Regression	7322.14	5	1464.43	144.32
Residual	142.06	14	10.15	
<i>Lack of fit</i>	263.78			
<i>Pure error</i>	121.72			
Total	7464.20	19		

R²=0.93; F_{0.05;5;14}=2.96

M, T, and B represent the parameters EG:FFA molar ratio, reaction temperature and biocatalyst concentration, respectively.

Mean, linear and quadratic terms of biocatalyst concentration (B and B²), linear term of reaction temperature (T), and linear and quadratic terms of EG:FFA molar ratio (M and M²) were statistically significant at 95% confidence level, since they have achieved p-values below 0.05. On the other hand, non-significant

parameters such as quadratic term of reaction temperature (T^2), and interactions ($T \times B$, $T \times M$, and $M \times B$) were excluded from the proposed model (p -values > 0.05). Regression coefficients of significant parameters depicted in Table 2 were used to write a quadratic equation to explain their effects on the response variable (OH conversion percentage – Y) in terms of coded values (Eq. (3)).

$$Y(\%) = 74.97 + 16.46M - 5.78M^2 + 10.33T + 8.49B - 6.04B^2 \quad (3)$$

where M , T , and B represent the EG:FFA molar ratio, reaction temperature and biocatalyst concentration, respectively.

The analysis of variance (ANOVA) shows that the proposed model was adequate and sufficient to represent actual relationships between independent and response variables at p -values below 0.05 (Table 2). A predicted determination coefficient (R^2) value of 0.95 is in well accordance with adjusted R^2 (0.93), which evidences the high accuracy of the proposed model. According to Table 2, Fisher's F -test also reveal some significance due to the fact that, regarding regression, the calculated F -value (144.32) was almost 49-times greater than the tabulated F -value at 5% significance level (2.96). Thus, it can also be used to create and explore response surfaces aiming to find optimal experimental conditions and maximize EG esters production.

Response surfaces and contour plots of interactions of biocatalyst concentration/EG:FFA molar ratio, and reaction temperature/EG:FFA molar ratio are illustrated in Fig. 3A and 3B, respectively.

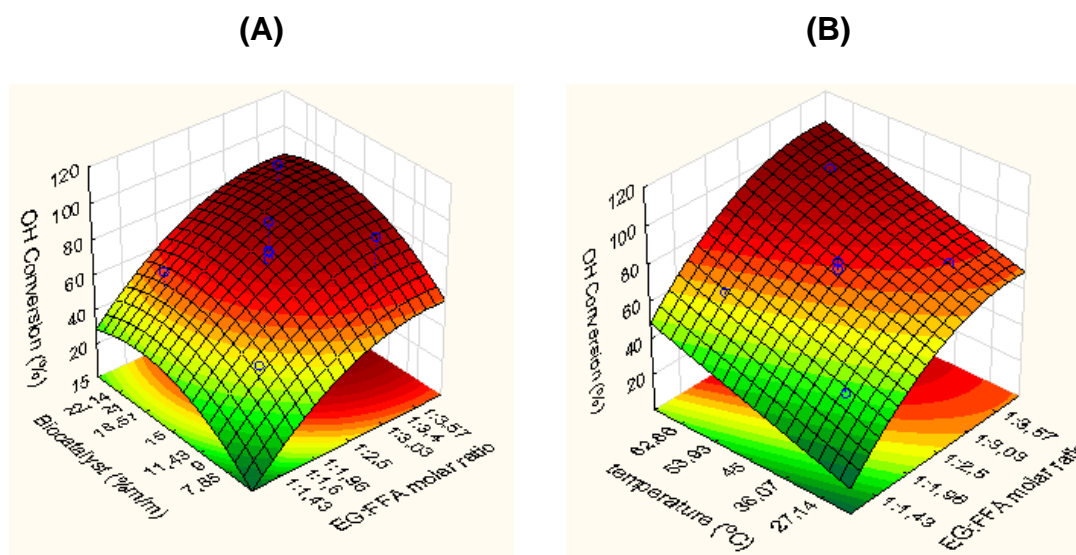


Figure 3- 3D response surfaces for enzymatic production of EG diesters. Effect of biocatalyst concentration and EG:FFA molar ratio (A), and effect of reaction temperature and EG:FFA molar ratio (B) on the OH conversion percentage.

Since esterification reactions are reversible processes, increased amounts of one of the reactants (EG or FFA) shifts the chemical equilibrium towards product formation [41], thus resulting in greater EG ester production expressed in terms of OH conversion percentage. Theoretically, two moles of FFA are required to produce diesters (see Fig. 1). Therefore, the effect of EG:FFA molar ratios ranging from 1:1 to 1:4 on EG ester production was evaluated. According to Fig. 3A, a gradual increase in OH conversion percentage by raising the amount of FFAs in the reaction mixture was observed, as expected. In fact, maximum OH conversion percentage values of over 90% were obtained using excess of FFA in the reaction mixture – esterification reactions performed in EG:FFA molar ratios ranging between 1:3 (coded value = +0.5) and 1:4 (coded value = +1.68). Biocatalyst concentration affects the reaction rate of ester production in the reaction mixture, in addition to prolonging contact time required to achieve maximum ester yields [21,22,52]. On the other hand, excess of biocatalyst amount may be inappropriate due to the adsorption of water molecules generated

on the biocatalyst surface during the reaction [56,57]. As a consequence, the chemical equilibrium is shifted towards the reverse reaction – hydrolysis [58]. In this context, it is important to determine proper biocatalyst concentration in the reactor to catalyze ester production. The effect of biocatalyst concentration from 5 to 25% m/m, in combination with EG:FFA molar ratio, was also evaluated (Fig. 3A). An increase in OH conversion percentage by raising biocatalyst concentration in the reactor from 5% m/m (coded value = -1.68) to 18–21% m/m (that corresponds to coded values of $+0.5$ and $+1$, respectively) was observed. Under such conditions, OH conversion percentage of 90% was achieved at 30 min of reaction. This is due to a greater amount of active sites in the mixture required to catalyze the reaction. A further increase in biocatalyst concentration (highest coded level of $+1.68 = 25\%$ m/m – see Table 1) has not improved EG ester production and optimal biocatalyst concentration was observed between 18% m/m (coded value = $+0.5$) and 21% m/m (coded value = $+1$). Their interaction was not significant at 95% confidence level.

The effect of the interaction between reaction temperature and EG:FFA molar ratio is illustrated in Fig. 3B. As esterification is an endothermic process, an increase in the reaction temperature positively affects chemical equilibrium and ester yields due to improving the solubility of starting materials and reducing viscosity, thus facilitating mass transfer process in the reaction mixture [58]. However, high reaction temperatures can distort the three-dimensional structure of the enzyme and result in a drastic decrease in its catalytic activity [22,50,52,59]. Thus, optimal reaction temperature determination is a crucial step for practical applications on enzymatic ester production, including several esters having lubricant properties [29,48,52]. As the reaction temperature was raised

from 20 (minimum level – coded value of -1.68) to $65-70$ °C (maximum level – coded values of $+1.34$ and $+1.68$), ester production gradually increased, which is expected since maximum OH conversion percentage of around 90% can be observed at the highest temperatures (ranging from 65 to 70 °C). These results suggest an increase in the reaction mixture viscosity by increasing the amount of FFA (optimal EG:FFA molar ratio between $1:3$ and $1:4$, as described in Fig. 3A) which requires high temperatures so as to prevent mass transfer limitations from reducing viscosity, thus improving enzymatic ester production. Although these two parameters are significant (see Eq. (3)), their interaction was also not significant at 95% confidence level.

The predicted model was validated by conducting five runs under optimal experimental conditions within the plateau regions obtained for the response surfaces shown in Figs. 3A and 3B. These results are summarized in Table 3. As it can be observed, the predicted values of OH conversion percentage derived from the proposed model (Eq. (3)) were also consistent with experimental data. As described above, maximum OH conversion percentage can be achieved at temperatures ranging between $65-70$ °C (coded values between $+1.34$ and $+1.68$), EG:FFA molar ratio between $1:3$ and $1:4$ (coded values from $+0.5$ to $+1.68$) and biocatalyst concentration from 18 to 21% m/m (coded values of $+0.5$ and $+1$).

Table 3- Validation of the developed CCRD by performing enzymatic production of EG esters under optimal experimental conditions.

Runs	Independent variables	OH Conversion
	Coded (actual)	(%)

	Biocatalyst (% m/m)	Reaction temperature (°C)	EG:FFA molar ratio	Experimental	Predicted ^a
1	+0.5 (18)	+1.68 (70)	+1.68 (1:4)	91.4 ± 7.7	106.4
2	+0.5 (18)	+1.34 (65)	+1.68 (1:4)	99.3 ± 1.0	102.9
3	+0.5 (18)	+1.34 (65)	+1 (1:3.4)	93.2 ± 6.8	102.2
4	+0.5 (18)	+1.34 (65)	+0.5 (1:3)	96.5 ± 3.5	98.3
5	+1 (21)	+1.34 (65)	+0.5 (1:3)	96.2 ± 5.3	98.1

^a values calculated according to Eq. (3).

An initial reaction (run #1) was performed at biocatalyst concentration of 18% m/m (coded value = +0.5), maximum reaction temperature – 70 °C (coded value = +1.68) and the highest EG:FFA molar ratio – 1:4 (coded value = +1.68). Under these conditions, OH conversion percentage of 91.4± 7.7% was achieved at 30 min of reaction. A subsequent test (run #2) was conducted by reducing reaction temperature to 65 °C (coded value = +1.34) through which a complete OH conversion (99.3±1.0%) was virtually achieved. These results indicate that some lipase molecules were thermally inactivated at maximum reaction temperature (70 °C). Thus, subsequent tests were performed at 65 °C (optimal reaction temperature), and then esterification at 65 °C was performed in an EG:FFA molar ratio of 1:3.4 (coded value = +1) and fixed biocatalyst concentration (18% m/m), thus maximum OH conversion percentage of 93.2±6.8% was observed (run #3). A fourth run was conducted in an EG:FFA molar ratio of 1:3 (coded value = +0.5), resulting in maximum OH conversion

percentage of $96.5 \pm 3.5\%$ at 30 min. This value is very close to those obtained using the highest EG:FFA molar ratio – 1:4 (see run #2 in Table 3). Based on these results, a nearly complete OH conversion percentage can be achieved in an EG:FFA molar ratio of 1:3, therefore being selected as optimal condition. In order to determine optimal biocatalyst concentration, a fifth run using a biocatalyst concentration of 21% m/m (coded value = +1) was performed under optimal reaction temperature (65 °C) and EG:FFA molar ratio (1:3) conditions, and a similar OH conversion percentage ($96.2 \pm 5.3\%$) was obtained at 18% m/m at 30 min of reaction. These results clearly reveal that esterification reactions performed using biocatalyst concentration of 18% m/m was enough to achieve maximum OH conversion percentage. According to these results, optimal experimental conditions to catalyze enzymatic EG esters production are 65 °C, EG:FFA molar ratio of 1:3 and biocatalyst concentration of 18% m/m.

3.3. Effect of contact time on an enzymatic production of EG esters

The effect of contact time on ester production was evaluated under optimal experimental conditions. In this set of experiments, esterification reactions were performed using the prepared heterogeneous biocatalyst and its catalytic activity was compared with soluble lipase (crude enzyme extract). Progress of the reaction catalyzed by immobilized Eversa[®] Transform 2.0 is shown in Fig. 4A.

A linear profile of ester production can also be observed during the initial 20 min of reaction, thus achieving OH conversion of around 83%. A complete OH conversion percentage was achieved at 40 min of reaction. In addition, a run under the same experimental conditions was performed using crude enzyme extract (homogeneous catalyst), but only 32.5% OH conversion percentage was

obtained (data not shown). This is due to the fact that there is a high tendency of lipases to form aggregates (dimers of lipases) in aqueous solutions that may result in mass transfer limitations [28,60]. These results clearly evidence that an appropriate immobilization technique is well capable of improving enzyme performance [21–23]. In fact, the use of a hydrophobic support, such as PSty-DVB beads, promotes lipase immobilization in its active conformation (monomeric form in open conformation), in addition to improving the partition of hydrophobic substrates, i.e. FFA, from the reaction mixture to the biocatalyst microenvironment [27,28,61], thus improving EG ester production.

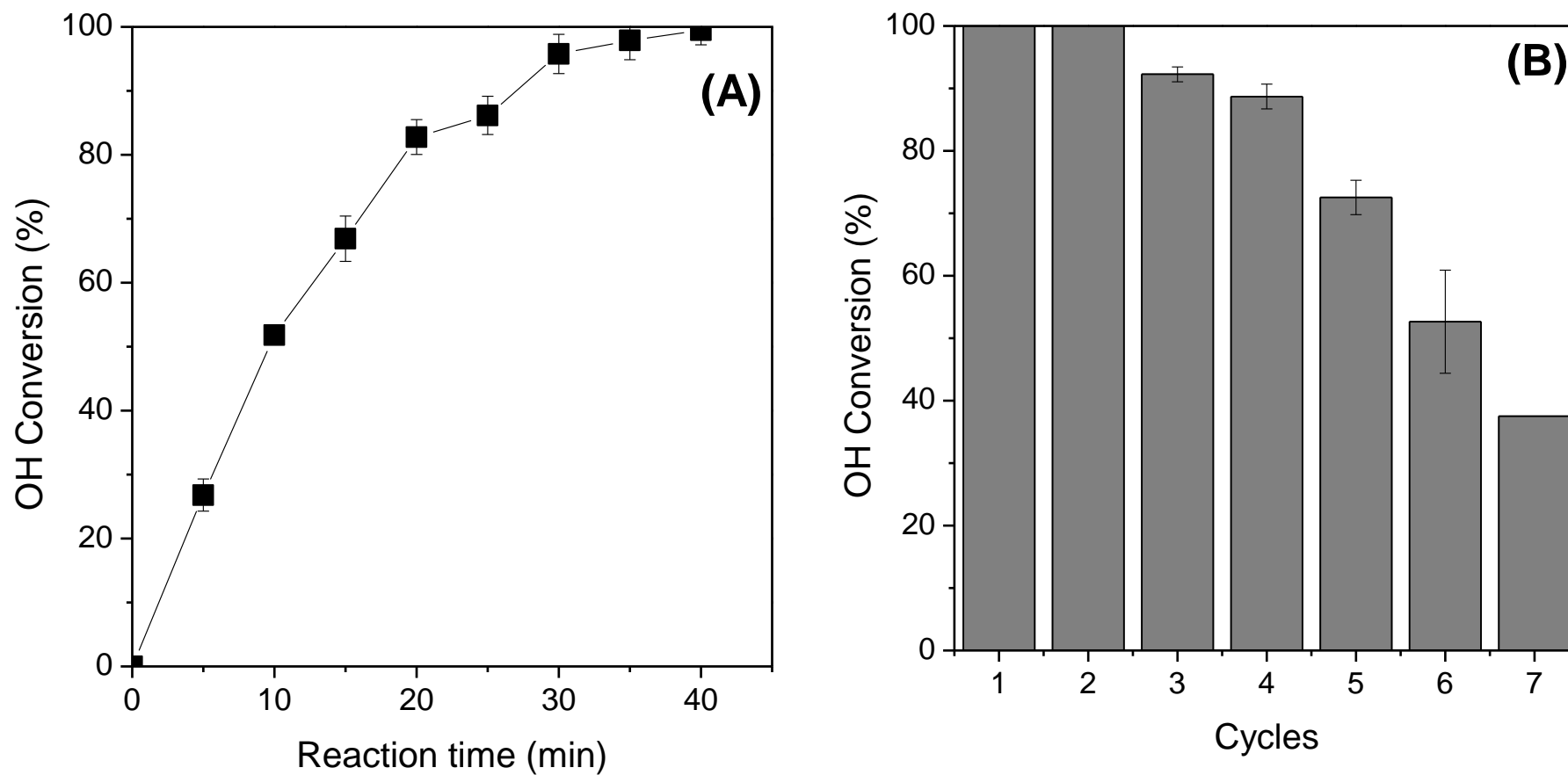


Figure 4- Effect of reaction time on the enzymatic production of EG esters (A) and operational stability tests (B) under optimal experimental conditions (EG:FFA molar ratio of 1:3, 65 °C, 240 rpm and biocatalyst concentration of 18% m/m).

3.4. Biocatalyst operational stability tests

Since lipases must be stable enough to be reused for successive esterification cycles, operational stability tests (seven consecutive esterification batches of 40 min each) were performed under optimal experimental conditions. According to Fig. 4B, the prepared heterogeneous biocatalyst retained all of its initial activity in the first two cycles of reaction (100% OH conversion). Afterwards, a slight decrease in its original activity can be observed and maximum OH conversion percentage of $\approx 90\%$ was obtained during 3rd and 4th cycles of reaction. Subsequently, there was a gradual decrease in the catalytic activity of immobilized Eversa[®] Transform 2.0 and after the 7th reaction cycle, and OH conversion percentage of 37% was achieved. Such decreased activity after successive reaction cycles can be due to accumulation of oxidation products [62], including polymerized FFAs, from the thermal processing of soybean oil that could have blocked the pores of heterogeneous biocatalysts, thus impeding the access of starting materials to its internal microenvironment. In addition, an accumulation of residual starting materials and/or products retained in the biocatalyst microenvironment can also lead to possible enzyme inactivation and/or desorption from the support surface [50,63].

3.5. Characterization of the produced EG esters

In this study, the ¹H NMR analysis was used to identify chemical signal modifications during an enzymatic EG ester production via esterification. Spectra at different reaction times (0, 10, 20 and 40 min of reaction) are shown in Fig. 5.

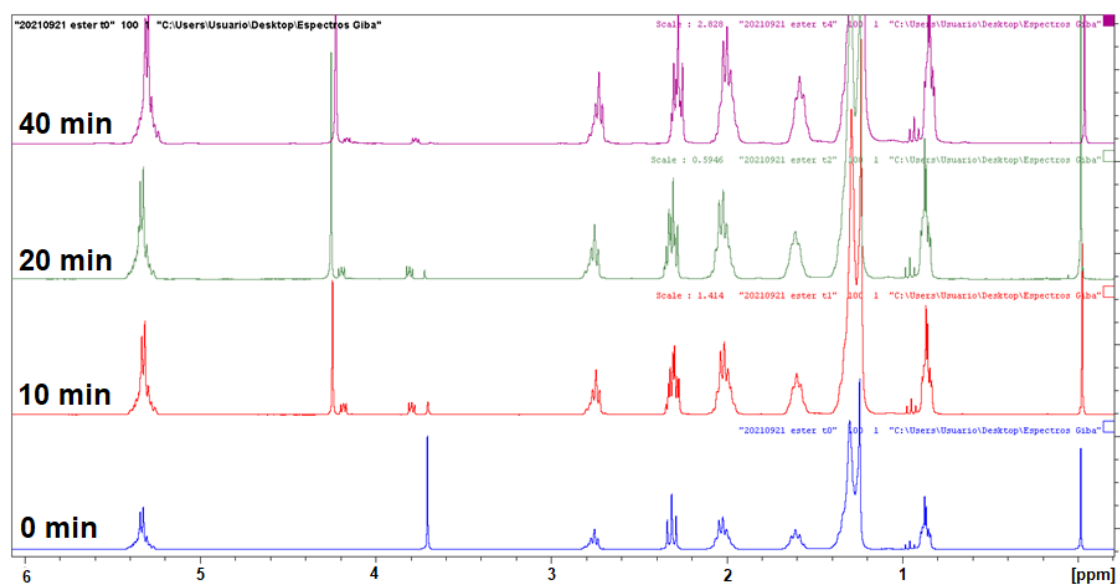


Figure 5- ^1H NMR spectra of EG diesters production at different reaction times.

Characteristic signals of starting materials (reaction mixture during the initial stage of the reaction) is shown in Fig. 5. The signal at 0.85 ppm refers to terminal-chain hydrogens ($-\text{CH}_3$) and an intense signal between 1.19 and 2.78 ppm is for sp^3 carbon hydrogens ($-\text{CH}_2-$) in the chemical structure of FFAs. A chemical signal between 5.24–5.38 ppm refers to hydrogens linked to sp^2 carbon – olefinic ($-\text{CH}=\text{CH}-$) of mono- and/or polyunsaturated FFA from USCO such as oleic, linoleic and linolenic acids (see USCO fatty acid composition in Section 2.1). Moreover, the signal at 2.76 ppm is characteristic of methylene groups ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{CH}-$) between two double bonds existing in the chemical structures of polyunsaturated FFAs (linoleic and linolenic acids) from USCO. The signal at 3.71 ppm is a broad signal characteristic of methylene hydrogens linked to hydroxyl groups ($-\text{CH}_2-\text{OH}$). It reveals the presence of EG in starting materials (Fig 5 at 0 min). On the other hand, a gradual decrease in intensity at 3.71 ppm, i.e. nearly inexistent at 40 min, can be observed, thus indicating nearly full OH conversion at 40 min of reaction in accordance with the titrimetric method (see Section 2.3 in “Materials and methods”). In fact, the appearance of an intense

signal at 4.23 ppm can be observed by raising contact time from 10 to 40 min of reaction. Such an intense signal is characteristic of hydrogen attached to carbon next to the ester group oxygen ($-\text{COOCH}_2-$), which evidences ester production. Moreover, the spectrum summarized in Fig. 5 obtained at 40 min of reaction clearly shows preferential EG diesters formation using the prepared biocatalyst (see representative scheme in Fig. 1).

The physical properties of produced EG diesters were determined according to standard methods (ASTM methods) and compared with EG esters produced via classical chemical catalysts described in literature [12–14,64], and commercial synthetic neopolyol esters from two companies: Emery Oleochemicals (Dehylube[®] 4016 and Dehylube[®] 4016 US) and Zschimmer & Schwarz (LEXOLUBE 3JN-310 and LUBRICIT NGDO). These commercial synthetic esters were selected for this comparative study due to their promising application as hydraulic fluids, gear oils, metal working fluids and environmentally acceptable lubricants – EAL's (Companies technical information) [65–68]. According to Table 4, kinematic viscosity values between 40 and 100 °C of produced EG diesters were similar to those produced from soybean oil and commercial synthetic esters. The viscosity index, a dimensionless parameter that represents how viscosity of a hydraulic fluid changes as temperature does [3], of produced EG diesters is in accordance with those reported for commercial synthetic esters (between 150 and 200) [65–68]. Pour point of a fluid is a critical parameter for its correct use at low temperatures. It indicates the lowest temperature at which it loses its flow properties [3]. According to the present results, pour point values of produced EG diesters were also very similar to those of commercial synthetic esters from Emery Oleochemicals and EG esters from

spent bleaching earth oil ($-7\text{ }^{\circ}\text{C}$). Similar density values between 0.86 and 0.92 can also be observed for all lubricant esters described in Table 4. This comparative study suggests that the produced EG diesters can be effectively used as green lubricant due to fact that their physical properties are in accordance with technical specifications of several commercial synthetic neopolyol esters and EG esters produced from several oleaginous feedstocks, especially soybean oil.

Table 4- Physical properties of the produced EG esters and comparison with other lubricant esters.

Properties	EG esters from USCO ^a	EG esters from spent bleaching earth oil ^b	EG esters from soybean oil ^c	EG esters from WCO ^d	EG esters from soybean oil ^e	Dehylube [®] 4016 ^f	Dehylube [®] 4016 US ^g	LEXOLUBE 3JN-310 ^h	LUBRICIT NGDO ⁱ
Kinematic viscosity at 40 °C (mm ² /s)	27.3 ± 1.6	9.75	≈22	74.74	27.643	22–27	22–27	30	24
Kinematic viscosity at 100 °C (mm ² /s)	5.7 ± 0.4	-	≈6.5	35.79	4.643	5.5–6.5	5.5–6.5	5.8	5.8
Viscosity index	166.2 ± 18.2	-	281	466	-	>200	>200	150	200
Pour point (°C)	-9 ± 2	-7	-5	-	-15	≤-20	≤-20	0	-30
Density at 20 °C	0.8794	0.91	-	0.895	0.86	0.88–0.92	0.86–0.90	-	-

a: This study / b: Reference [12]

c: Reference [13] / d: Reference [14]

e: Reference [64] / f: Reference [65]

g: Reference [66] / h: Reference [67]

i: Reference [68]

3.6. Comparison with other studies

The results obtained herein were compared with those found in literature about EG ester production (Table 5). These previous reports were performed using different classical chemical catalysts (homogeneous or heterogeneous base catalysts) via two-step transesterification processes [12–14,64,69]. These comprise sequential FAMEs production via transesterification of several oleaginous feedstocks using methanol, followed by transesterification reactions of FAMEs produced using EG. Reaction times required to achieve maximum conversion/yields summarized in Table 5 are the ones obtained for EG esters production in the second step exclusively (transesterification of FAMEs using EG or FFA esterification using EG –present study strategy). In general, high conversion/yields percentage (above 88%) can be observed for different oleaginous feedstocks (edible or non-edible oils) using classical base catalysts (methoxides or calcium oxide – CaO). However, these reaction systems require contact times between 1.5 h and 2.5 h and temperatures from 120 to 170 °C to achieve high conversion yields. Moreover, reuse tests using classical base catalysts, including a heterogeneous base catalyst (CaO), have not been performed yet. It is worth emphasizing that a much shorter reaction time (only 40 min of reaction) was enough to achieve full OH conversion under milder conditions (reaction temperature of 65 °C and atmospheric pressure using open reactors) in this study. Moreover, the prepared biocatalyst retained 37% of its original catalytic activity after seven reaction cycles in a batch mode. This clearly evidences that the prepared heterogeneous biocatalyst (Eversa® Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB beads) is an attractive option for sustainable EG diester production due to its high catalytic activity under

moderate conditions, in addition to the possibility of reuse after successive reaction cycles.

Table 5- Bibliographic survey for EG esters production using several catalysts and oleaginous feedstocks.

Oleaginous feedstock	Catalyst	Experimental conditions	Yield/Conversion (%)	Reaction time (h)	Reuse (residual activity - %)	Reference
Spent bleaching earth oil	Potassium methoxide	Transesterification of FAMEs ^a with EG (molar ratio of 3.5:1, and 170 °C).	93	2.5	NP ^b	[12]
Sunflower, soybean, jatropha and WCO.	CaO	Transesterification of FAMEs ^a with EG (molar ratio of 2:1, 150 °C, 1.2% m/m of catalyst, under vacuum).	100	2	NP ^b	[13]
Waste cooking oil (WCO)	CaO	Transesterification of FAMEs ^a with EG (molar ratio of 3.5:1, 130 °C, 1.2% m/m of catalyst, under vacuum).	100	1.5	NP ^b	[14]
Palm kernel and soybean oils	Sodium methoxide	Transesterification of FAMEs ^a with EG (molar ratio of 3.5:1, 120 °C, and 0.8% m/m of catalyst).	88 (soybean oil) and 92 (palm kernel oil)	2.5	NP ^b	[64]
Palm kernel oil	Sodium methoxide	Transesterification of FAMEs ^a with EG (molar ratio of 3:1, 135 °C, 1.2% m/m of catalyst, under vacuum).	93.08	2.48	NP ^b	[69]
USCO (WCO)	Immobilized Eversa [®] Transform 2.0 on PSty-DVB	Esterification of FFA with EG (molar ratio of 3:1, 65 °C, 15% m/m of biocatalyst and 240 rpm).	100	0.67 (40 min)	7 (37)	This study

a: fatty acid methyl esters.

b: not performed.

4. Conclusion

In this study, an environmentally friendly process for an enzymatic production of glycol esters from used soybean cooking oil (USCO) has been successfully developed via a two-step enzymatic process (hydroesterification) performed in a solvent-free system. In the initial step, a mixture of FFA was produced via complete hydrolysis using CRL as catalyst. FFA esterification using glycols was catalyzed by a low-cost lipase (Eversa[®] Transform 2.0) immobilized on PSty-DVB beads via interfacial activation. Four different glycols were selected as starting materials and the highest catalytic activity was observed for ethylene glycol (EG). Optimal experimental conditions for EG ester production were 65 °C, EG:FFA molar ratio of 1:3 and biocatalyst concentration of 18% m/m. Under such conditions, OH conversion of 100% was achieved at 40 min of reaction using the prepared biocatalyst, while soluble lipase exhibited only 32.5% of OH conversion. Preferential EG diesters formation has been confirmed by the ¹H NMR analysis. These results demonstrate that immobilization is an important strategy for preparing high-performance biocatalysts for esterification reactions. The prepared heterogeneous biocatalyst can be easily separated from the reaction mixture via a simple process (filtration) and reused after seven successive esterification batches. The physical properties of EG diesters such as viscosity, viscosity index, pour point and density are in accordance with EG esters from soybean oil described in literature and commercial synthetic neopolyol esters, thus evidencing their excellent properties as green lubricants. This study shows a potential application of Eversa[®] Transform 2.0 immobilized on PSty-DVB as heterogeneous biocatalyst to produce synthetic esters having lubricant properties via a sustainable and eco-friendly process (solvent-free system) due to its low-cost, high catalytic activity under moderate experimental conditions and reusability. Other edible and non-edible Brazilian oils from animal fats

and vegetable oils should also be used as potential feedstocks in glycol diesters production through the proposed two-step process (hydroesterification).

References

- [1] Lubrication applications – Technology transfer services, <https://www.techtransfer.com/blog/lubrication-applications/> (accessed September 11, 2021).
- [2] A.Z. Syahir, N.W.M. Zulkifli, H.H. Masjuki, M.A. Kalam, A. Alabdulkarem, M. Gulzar, L.S. Khuong, M.H. Harith, A review on bio-based lubricants and their applications, *J. Clean. Prod.* 168 (2017) 997–1016. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2017.09.106>.
- [3] N.A. Zainal, N.W.M. Zulkifli, M. Gulzar, H.H. Masjuki, A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 82 (2018) 80–102. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2017.09.004>.
- [4] Lubricants Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application (Industrial, Marine, Automotive, Aerospace), By Region (Asia Pacific, North America, Europe, MEA), And Segment Forecasts, 2021 - 2028, (n.d.). <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lubricants-market>.
- [5] C.K. Ho, K.B. McAuley, B.A. Peppley, Biolubricants through renewable hydrocarbons: A perspective for new opportunities, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 113 (2019) 109261. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109261>.
- [6] T.M. Panchal, A. Patel, D.D. Chauhan, M. Thomas, J. V. Patel, A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources, *Renew. Sustain. Energy Rev.* 70 (2017) 65–70. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2016.11.105>.
- [7] I.C.A. Bolina, R.A.B. Gomes, A.A. Mendes, Biolubricant production from several

- oleaginous feedstocks using lipases as catalysts: Current scenario and future perspectives, *BioEnergy Res.* 2021. (2021) 1–19. <https://doi.org/10.1007/S12155-020-10242-4>.
- [8] Global vegetable oil consumption, 2019/20 | Statista, (n.d.). <https://www.statista.com/statistics/263937/vegetable-oils-global-consumption/> (accessed September 15, 2021).
- [9] M.I. Loizides, X.I. Loizidou, D.L. Orthodoxou, D. Petsa, Circular bioeconomy in action: Collection and recycling of domestic used cooking oil through a social, reverse logistics system, *Recycl.* 2019, Vol. 4, Page 16. 4 (2019) 16. <https://doi.org/10.3390/RECYCLING4020016>.
- [10] Z. Gao, Y. Ma, Y. Liu, Q. Wang, Waste cooking oil used as carbon source for microbial lipid production: Promoter or inhibitor, *Environ. Res.* 203 (2022) 111881. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2021.111881>.
- [11] F. Fangfang, A. Alagumalai, O. Mahian, Sustainable biodiesel production from waste cooking oil: ANN modeling and environmental factor assessment, *Sustain. Energy Technol. Assessments.* 46 (2021) 101265. <https://doi.org/10.1016/J.SETA.2021.101265>.
- [12] Sukirno, L. Farhandika, Synthesis and characterization of ethylene glycol ester from spent bleaching earth oil and ethylene glycol as hydraulic lubricants, *AIP Conf. Proc.* 2255 (2020) 060015. <https://doi.org/10.1063/5.0021783>.
- [13] N.K. Attia, S.A. El-Mekkawi, O.A. Elardy, E.A. Abdelkader, Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils, *Fuel.* 271 (2020) 117578. <https://doi.org/10.1016/J.FUEL.2020.117578>.
- [14] R.Z.K. Hussein, N.K. Attia, M.K. Fouad, S.T. ElSheltawy, Experimental investigation and process simulation of biolubricant production from waste

- cooking oil, *Biomass and Bioenergy*. 144 (2021) 105850. <https://doi.org/10.1016/J.BIOMBIOE.2020.105850>.
- [15] K.V. Fernandes, A. Papadaki, J.A.C. da Silva, R. Fernandez-Lafuente, A.A. Koutinas, D.M.G. Freire, Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties, *Ind. Crops Prod.* 116 (2018) 90–96. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.02.058>.
- [16] K. V. Fernandes, E.D.C. Cavalcanti, E.P. Cipolatti, E.C.G. Aguiéiras, M.C.C. Pinto, F.A. Tavares, P.R. da Silva, R. Fernandez-Lafuente, S. Arana-Peña, J.C. Pinto, C.L.B. Assunção, J.A.C. da Silva, D.M.G. Freire, Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase, *Catal. Today*. 362 (2021) 122–129. <https://doi.org/10.1016/j.cattod.2020.03.060>.
- [17] P. Adlercreutz, Immobilisation and application of lipases in organic media, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6406–6436. <https://doi.org/10.1039/c3cs35446f>.
- [18] L. Zhong, Y. Feng, G. Wang, Z. Wang, M. Bilal, H. Lv, S. Jia, J. Cui, Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production, *Int. J. Biol. Macromol.* 152 (2020) 207–222. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.258>.
- [19] C. Garcia-Galan, Á. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, R.C. Rodrigues, Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance, *Adv. Synth. Catal.* 353 (2011) 2885–2904. <https://doi.org/10.1002/adsc.201100534>.
- [20] R.C. Rodrigues, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R. Fernández-Lafuente, Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 6290–6307. <https://doi.org/10.1039/c2cs35231a>.

- [21] V.C. Badgujar, K.C. Badgujar, P.M. Yeole, B.M. Bhanage, Investigation of effect of ultrasound on immobilized *Candida rugosa* lipase: Synthesis of biomass based furfuryl derivative and green metrics evaluation study, *Enzyme Microb. Technol.* 144 (2021) 109738. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2020.109738>.
- [22] K.C. Badgujar, B.M. Bhanage, Immobilization of lipase on biocompatible copolymer of polyvinyl alcohol and chitosan for synthesis of laurate compounds in supercritical carbon dioxide using response surface methodology, *Process Biochem.* 50 (2015) 1224–1236. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2015.04.019>.
- [23] J.A. Martínez-Sánchez, S. Arana-Peña, D. Carballares, M. Yates, C. Otero, R. Fernandez-Lafuente, Immobilized biocatalysts of Eversa[®] Transform 2.0 and lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Comparison of some properties and performance in biodiesel production, *Catalysts.* 10 (2020) 738. <https://doi.org/10.3390/catal10070738>.
- [24] F.L.C. Almeida, M.P.J. Castro, B.M. Travália, M.B.S. Forte, Trends in lipase immobilization: Bibliometric review and patent analysis, *Process Biochem.* 110 (2021) 37–51. <https://doi.org/10.1016/J.PROCBIO.2021.07.005>.
- [25] M. Bilal, C.D. Fernandes, T. Mehmood, F. Nadeem, Q. Tabassam, L.F.R. Ferreira, Immobilized lipases-based nano-biocatalytic systems — A versatile platform with incredible biotechnological potential, *Int. J. Biol. Macromol.* 175 (2021) 108–122. <https://doi.org/10.1016/J.IJBIOMAC.2021.02.010>.
- [26] R.C. Rodrigues, J.J. Virgen-Ortíz, J.C.S. dos Santos, Á. Berenguer-Murcia, A.R. Alcantara, O. Barbosa, C. Ortiz, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages,

- problems, and solutions, *Biotechnol. Adv.* 37 (2019) 746–770. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.
- [27] R. C. Rodrigues, K. Hernandez, O. Barbosa, N. Rueda, C. Garcia-Galan, J. C. S. dos Santos, A. Berenguer-Murcia, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of proteins in poly-styrene-divinylbenzene matrices: Functional properties and applications, *Curr. Org. Chem.* 19 (2015) 1707–1718. <https://doi.org/10.2174/1385272819666150429231728>.
- [28] E.A. Manoel, J.C.S. dos Santos, D.M.G. Freire, N. Rueda, R. Fernandez-Lafuente, Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme, *Enzyme Microb. Technol.* 71 (2015) 53–57. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2015.02.001>.
- [29] J.J. Bassi, L.M. Toderó, F.A.P. Lage, G.I. Khedy, J.D. Ducas, A.P. Custódio, M.A. Pinto, A.A. Mendes, Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester, *Int. J. Biol. Macromol.* 92 (2016). <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.097>.
- [30] L. Sarda, P. Desnuelle, Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion, *Biochim. Biophys. Acta.* 30 (1958) 513–521. [https://doi.org/10.1016/0006-3002\(58\)90097-0](https://doi.org/10.1016/0006-3002(58)90097-0).
- [31] R. Verger, ‘Interfacial activation’ of lipases: facts and artifacts, *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 32–38. [https://doi.org/10.1016/S0167-7799\(96\)10064-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7799(96)10064-0).
- [32] R.D. Schmid, R. Verger, Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications, *Angew. Chemie Int. Ed.* 37 (1998) 1608–1633. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-3773\(19980703\)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-3773(19980703)37:12<1608::AID-ANIE1608>3.0.CO;2-V).
- [33] A.P.P. Bressani, K.C.A. Garcia, D.B. Hirata, A.A. Mendes, Production of alkyl

- esters from macaw palm oil by a sequential hydrolysis/esterification process using heterogeneous biocatalysts: Optimization by response surface methodology, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2015) 287–297. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1267-5>.
- [34] E.D.C. Cavalcanti, É.C.G. Aguiéiras, P.R. da Silva, J.G. Duarte, E.P. Cipolatti, R. Fernandez-Lafuente, J.A.C. da Silva, D.M.G. Freire, Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*, *Fuel*. 215 (2018) 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2017.11.119>.
- [35] P. Domínguez De María, J.M. Sánchez-Montero, J. V. Sinisterra, A.R. Alcántara, Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview, *Biotechnol. Adv.* 24 (2006) 180–196. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.09.003>.
- [36] M.S. Barbosa, C.C.C. Freire, L.C. Almeida, L.S. Freitas, R.L. Souza, E.B. Pereira, A.A. Mendes, M.M. Pereira, Á.S. Lima, C.M.F. Soares, Optimization of the enzymatic hydrolysis of *Moringa oleifera* Lam oil using molecular docking analysis for fatty acid specificity, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 66 (2019) 823–832. <https://doi.org/10.1002/bab.1793>.
- [37] R.R.C. Monteiro, S. Arana-Peña, T.N. da Rocha, L.P. Miranda, Á. Berenguer-Murcia, P.W. Tardioli, J.C.S. dos Santos, R. Fernandez-Lafuente, Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution?, *Renew. Energy*. 164 (2021) 1566–1587. <https://doi.org/10.1016/J.RENENE.2020.10.071>.
- [38] M. Coppini, J.D. Magro, R. Martello, A. Valério, M.C. Zenevycz, D. de Oliveira, J. V Oliveira, Production of methyl esters by enzymatic hydroesterification of chicken fat industrial residue, *Brazilian J. Chem. Eng.* 36 (2019) 923–928.

- <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190362s20180389>.
- [39] J.H.C. Wancura, A.L. Fantinel, G.A. Ugalde, F.F. Donato, J. Vladimir de Oliveira, M. V. Tres, S.L. Jahn, Semi-continuous production of biodiesel on pilot scale via enzymatic hydroesterification of waste material: Process and economics considerations, *J. Clean. Prod.* 285 (2021) 124838. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2020.124838>.
- [40] J.R. Guimarães, L.P. Miranda, R. Fernandez-Lafuente, P.W. Tardioli, Immobilization of Eversa[®] Transform via CLEA technology converts it in a suitable biocatalyst for biolubricant production using waste cooking oil, *Molecules*. 26 (2021) 193. <https://doi.org/10.3390/molecules26010193>.
- [41] R.R. Sousa, A.S. Silva, R. Fernandez-Lafuente, V.S. Ferreira-Leitão, Solvent-free esterifications mediated by immobilized lipases: a review from thermodynamic and kinetic perspectives, *Catal. Sci. Technol.* 11 (2021) 5696–5711. <https://doi.org/10.1039/D1CY00696G>.
- [42] V. Kasche, Mechanism and yields in enzyme catalysed equilibrium and kinetically controlled synthesis of β -lactam antibiotics, peptides and other condensation products, *Enzyme Microb. Technol.* 8 (1986) 4–16. [https://doi.org/10.1016/0141-0229\(86\)90003-7](https://doi.org/10.1016/0141-0229(86)90003-7).
- [43] G. Sandoval, J.S. Condoret, P. Monsan, A. Marty, Esterification by immobilized lipase in solvent-free media: Kinetic and thermodynamic arguments, *Biotechnol. Bioeng.* 78 (2002) 313–320. <https://doi.org/10.1002/bit.10224>.
- [44] J.-S.C. Alain Marty, Valérie Dossat, Continuous operation of lipase-catalyzed reactions in nonaqueous solvents: Influence of the production of hydrophilic compound, *Biotechnol. Bioeng.* 56 (1997) 232–237. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19971020\)56:2<232::AID-](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19971020)56:2<232::AID-)

BIT12>3.0.CO;2-I.

- [45] E. Séverac, O. Galy, F. Turon, C.A. Pantel, J.S. Condoret, P. Monsan, A. Marty, Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact, *Enzyme Microb. Technol.* 48 (2011) 61–70. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2010.09.008>.
- [46] B.C. Páez, A.R. Medina, F.C. Rubio, P.G. Moreno, E.M. Grima, Modeling the effect of free water on enzyme activity in immobilized lipase-catalyzed reactions in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.* 33 (2003) 845–853. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(03\)00219-9](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(03)00219-9).
- [47] M.D. Alves, F.M. Aracri, É.C. Cren, A.A. Mendes, Isotherm, kinetic, mechanism and thermodynamic studies of adsorption of a microbial lipase on a mesoporous and hydrophobic resin, *Chem. Eng. J.* 311 (2017) 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2016.11.069>.
- [48] R.N. Vilas Bôas, R. de Lima, A.A. Mendes, L. Freitas, H.B.S. Bento, A.K.F. d. Carvalho, H.F. de Castro, Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: Lipase screening, reactor system development, and reaction optimization, *Chem. Eng. Process.* 168 (2021) 108568. <https://doi.org/10.1016/J.CEP.2021.108568>.
- [49] M.J. Costa, M.R.L. Silva, E.E.A. Ferreira, A.K.F. Carvalho, R.C. Basso, E.B. Pereira, H.F. de Castro, A.A. Mendes, D.B. Hirata, Enzymatic biodiesel production by hydroesterification using waste cooking oil as feedstock, *Chem. Eng. Process. - Process Intensif.* 157 (2020) 108131. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2020.108131>.
- [50] P.A. Mendoza-Ortiz, R.S. Gama, O.C. Gómez, J.H.H. Luiz, R. Fernandez-Lafuente, E.C. Cren, A.A. Mendes, Sustainable enzymatic synthesis of a solketal

- ester—Process optimization and evaluation of its antimicrobial activity, *Catalysts*. 10 (2020) 218. <https://doi.org/10.3390/catal10020218>.
- [51] M.S. Barbosa, C.C.C. Freire, L.M.S. Brandão, E.B. Pereira, A.A. Mendes, M.M. Pereira, Á.S. Lima, C.M.F. Soares, Biolubricant production under zero-waste *Moringa oleifera* Lam biorefinery approach for boosting circular economy, *Ind. Crops Prod.* 167 (2021) 113542. <https://doi.org/10.1016/J.INDCROP.2021.113542>.
- [52] F.M.A. Manan, N. Attan, Z. Zakaria, A.S.A. Keyon, R.A. Wahab, Enzymatic esterification of eugenol and benzoic acid by a novel chitosan-chitin nanowhiskers supported *Rhizomucor miehei* lipase: Process optimization and kinetic assessments, *Enzyme Microb. Technol.* 108 (2018) 42–52. <https://doi.org/10.1016/J.ENZMICTEC.2017.09.004>.
- [53] M.H.M. Avelar, D.M.J. Cassimiro, K.C. Santos, R.C.C. Domingues, H.F. De Castro, A.A. Mendes, Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds, *Ind. Crops Prod.* 44 (2013) 452–458. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.011>.
- [54] N.B. Machado, J.P. Miguez, I.C.A. Bolina, A.B. Salviano, R.A.B. Gomes, O.L. Tavano, J.H.H. Luiz, P.W. Tardioli, É.C. Cren, A.A. Mendes, Preparation, functionalization and characterization of rice husk silica for lipase immobilization via adsorption, *Enzyme Microb. Technol.* 128 (2019) 9–21. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2019.05.001>.
- [55] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [56] S. Colombié, R.J. Tweddell, J.-S. Condoret, A. Marty, Water activity control: A

- way to improve the efficiency of continuous lipase esterification, *Biotechnol. Bioeng.* 60 (1998) 362–368. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19981105\)60:3<362::AID-BIT13>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19981105)60:3<362::AID-BIT13>3.0.CO;2-O).
- [57] X. Xia, C. Wang, B. Yang, Y.-H. Wang, X. Wang, Water activity dependence of lipases in non-aqueous biocatalysis, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 159 (2009) 759–767. <https://doi.org/10.1007/S12010-009-8618-8>.
- [58] A.G. Jacob, R.A. Wahab, N.A. Mahat, Ternary biogenic silica/magnetite/graphene oxide composite for the hyperactivation of *Candida rugosa* lipase in the esterification production of ethyl valerate, *Enzyme Microb. Technol.* 148 (2021) 109807. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2021.109807>.
- [59] L.M. Toderó, J.J. Bassi, F.A. Lage, M.C. Corradini, J.C. Barboza, D.B. Hirata, A.A. Mendes, Enzymatic synthesis of isoamyl butyrate catalyzed by immobilized lipase on poly-methacrylate particles: optimization, reusability and mass transfer studies, *Bioprocess Biosyst. Eng.* 38 (2015) 1601–1613. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1402-y>.
- [60] J.M. Palomo, M. Fuentes, G. Fernández-Lorente, C. Mateo, J.M. Guisan, R. Fernández-Lafuente, General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 1–6. <https://doi.org/10.1021/bm025729+>.
- [61] O. Barbosa, C. Ortiz, Á. Berenguer-Murcia, R. Torres, R.C. Rodrigues, R. Fernández-Lafuente, Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts, *Biotechnol. Adv.* 33 (2015) 435–456. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.03.006>.
- [62] R.A. Abd Razak, A.H. Ahmad Tarmizi, A. Kuntom, M. Sanny, I.S. Ismail, Intermittent frying effect on French fries in palm olein, sunflower, soybean and

- canola oils on quality indices, 3-monochloropropane-1,2-diol esters (3-MCPDE), glycidyl esters (GE) and acrylamide contents, *Food Control*. 124 (2021) 107887. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2021.107887>.
- [63] J.J. Virgen-Ortíz, V.G. Tacias-Pascacio, D.B. Hirata, B. Torrestiana-Sanchez, A. Rosales-Quintero, R. Fernandez-Lafuente, Relevance of substrates and products on the desorption of lipases physically adsorbed on hydrophobic supports, *Enzyme Microb. Technol.* 96 (2017) 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2016.09.010>.
- [64] S.E. Sanni, E. Emeteri, V.E. Efeovbokhan, J.D. Udonne, Process Optimization of the Transesterification Processes of Palm Kernel and Soybean Oils for Lube Oil Synthesis, *Int. J. Appl. Eng. Res.* 12 (2017) 4113–4129. <http://www.ripublication.com> (accessed September 11, 2021).
- [65] E. Oleochemicals, S. Bhd, E.O. Gmbh, DEHYLUB ® 4016, (n.d.). www.emeryoleo.com (accessed September 11, 2021).
- [66] E. Oleochemicals, S. Bhd, E.O. Gmbh, DEHYLUB ® 4016 US, (n.d.). www.emeryoleo.com (accessed September 11, 2021).
- [67] Lexolube 3JN-310 - zslubes, (n.d.). <https://zslubes.com/product/lexolube-3jn-310/> (accessed March 21, 2021).
- [68] Lubricit NGDO - zslubes, (n.d.). <https://zslubes.com/product/lubricit-ngdo/> (accessed September 11, 2021).
- [69] M. Ibrahim Shaba, A. Mohammed, D. Solomon Musa, B. Ayuba Audu, Y. Baba Katamba, Synthesis and optimization process of ethylene glycol-based biolubricant from palm kernel oil (PKO), *J. Renew. Energy Environ.* (2018) 1–9. <https://doi.org/10.30501/JREE.2018.88495>.

4. CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, um processo ambientalmente correto para a produção enzimática de ésteres lubrificantes de etileno glicol a partir de óleo de soja processado foi desenvolvido por hidroesterificação. Na primeira etapa, uma mistura de AGL foi produzida por hidrólise completa do óleo catalisada por LCR. Na segunda etapa do processo, os AGL produzidos na etapa de hidrólise foram empregados na produção enzimática de ésteres em meio isento de solventes e em reatores abertos para favorecer a evaporação de água formada na reação. Esta etapa foi conduzida empregando um catalisador de baixo custo (Eversa[®] Transform 2.0) imobilizado via ativação interfacial em partículas hidrofóbicas de poli (estireno-divinilbenzeno). Os resultados obtidos demonstraram excelente capacidade de adsorção da enzima, uma importante opção para o setor industrial (preparação de biocatalisadores com alta atividade catalítica). Dentre os diferentes glicóis avaliados, máxima atividade catalítica da lipase imobilizada foi obtida para etilenoglicol (EG), selecionado para análises posteriores. Por meio de um DCCR, as melhores condições experimentais de produção dos ésteres de EG foram 65°C, razão molar EG:AGL de 1:3 e concentração de biocatalisador de 18% m/m. Sob tais condições, completa conversão dos grupos OH de EG foi alcançada em apenas 40 min. Nestas mesmas condições, a lipase solúvel exibiu uma conversão de apenas 32,5%. A formação de diésteres de EG foi confirmada por análise de ¹H RMN, na qual está de acordo com o método titulométrico empregado neste estudo para a determinação da conversão. Esses resultados demonstram que a técnica de imobilização foi uma estratégia importante para a preparação de biocatalisadores com melhor desempenho na reação de esterificação. O biocatalisador heterogêneo preparado pode ser facilmente separado da mistura reacional por meio de um processo simples de filtração e reutilizado após sete bateladas sucessivas de esterificação. As propriedades físicas dos diésteres de EG como viscosidade, índice de viscosidade, ponto de fluidez e densidade estão de acordo com as dos ésteres de EG de óleo de soja descritos na literatura e os ésteres sintéticos comerciais de neopoliol, mostrando assim suas excelentes propriedades como lubrificante verde. Este estudo demonstra o potencial de aplicação da Eversa[®] Transform 2.0 imobilizada como biocatalisador heterogêneo na produção de ésteres sintéticos com propriedades lubrificantes por meio de um processo sustentável e

ecologicamente correto (sistema livre de solvente) devido ao seu baixo custo e alta atividade catalítica em condições experimentais moderadas e boa capacidade de reutilização. Outros óleos brasileiros comestíveis e não comestíveis como gorduras animais e óleos vegetais também podem ser utilizados como matérias-primas na produção de diésteres de glicol pelo processo proposto (hidroesterificação).

5. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Produção contínua de diésteres em reatores em modo contínuo (reator de fluxo pistonado, reator contínuo de tanque agitado e reator de leito fluidizado);
- Avaliação da produção contínua em múltiplos estágios empregando leitos de adsorção de água produzidos (leito contendo peneira molecular ou sílica);
- Aplicação de outros óleos vegetais comumente encontrados em nosso Estado como macaúba, Jatropha e mamona.
- Estudos de viabilidade econômica.
- Aplicação de outros procedimentos de imobilização da enzima com o intuito de aumentar a sua estabilidade após sucessivas reações.