

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA**

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE
ÓLEOS VEGETAIS ÁCIDOS E/OU RESÍDUOS INDUSTRIAIS DO
PROCESSAMENTO DE ÓLEOS VEGETAIS**

Luiza Gambetta Figueiredo

Trabalho de Graduação apresentado ao
Departamento de Engenharia Química da
Universidade Federal de São Carlos para
obtenção do Bacharelado em Engenharia
Química.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

**São Carlos
2024**

BANCA EXAMINADORA

Trabalho de Graduação apresentado no dia 22 de janeiro de 2024 perante a seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli, DEQ/UFSCar

Convidado: Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior, DEQ/UFSCar

Professor da Disciplina: Prof. Dr. José Maria Corrêa Bueno, DEQ/UFSCar

AGRADECIMENTOS

Agradeço o apoio financeiro da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP, da Financiadora de Estudos e Projetos - FINEP, e do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações - MCTI, por meio do Programa de Recursos Humanos da ANP para o Setor de Biocombustíveis - PRH-ANP/FINEP.

Agradeço, também, à todas as pessoas que me auxiliaram e tornaram esse trabalho possível, especialmente ao Dr. Rafael de Araujo-Silva e a Ma. Ana Bárbara Moulin Cansian por toda a mentoria e acompanhamento ao longo das etapas desse projeto.

Agradeço ao Prof. Dr. Ruy de Sousa Júnior por ter me orientado durante o entendimento das ferramentas e software de programação necessários para realizar os estudos cinéticos.

Um agradecimento especial ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli por todos os ensinamentos, disponibilidade, mentoria e acompanhamento durante mais de dois anos de trabalho.

Deixo aqui meu profundo agradecimento pelos meus amigos, minha segunda família. Em especial, à Maria Julia Barros, Anna Julia Rocha, Laura Moreira, Luana Duarte, Luanna Farinha, Gabriele Martins e Diego Angelo, agradeço por todos os momentos que passamos juntos, por toda alegria e parceria em momentos bons e ruins, sem vocês não teria chegado aonde estou.

Aos meus amigos Beatriz, Gustavo, Renata e Thayna agradeço pela rede de apoio que me sustentou nos últimos oito anos. Obrigada por terem sempre me apoiado nas minhas decisões, espero que nossa amizade perdure eternamente.

Ao meu irmão gêmeo, Guilherme, obrigada pelo exemplo de perseverança e independência, você é e sempre será o meu melhor amigo, a pessoa que posso contar para qualquer coisa.

Agradeço aos meus irmãos, Renan e Victor, por sempre me apoiarem, por todas as aventuras que tivemos, e por serem exemplos de pessoas e profissionais.

Por fim, agradeço meus pais, Elaine e Vicente pelo amor incondicional, por todo acolhimento ao longo dos anos, pelos incentivos, por me impulsionarem a ser a minha melhor versão e por acreditarem em mim a cada passo da minha trajetória.

RESUMO

Em meio ao cenário atual de transição energética, os biolubrificantes são uma alternativa interessante na substituição dos óleos lubrificantes provenientes de fontes fósseis, os quais são os mais utilizados no mercado para reduzir efeitos de atrito entre superfícies, dentre outras inúmeras aplicações. Os biolubrificantes são formados majoritariamente em sua composição por ésteres de ácidos graxos, os quais podem ser derivados de biomassa, como óleos vegetais, a partir de reações de transesterificação de óleos vegetais ou esterificação de ácidos graxos com álcoois de cadeia linear longa ou ramificadas ou ainda polióis. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção enzimática de ésteres bases para biolubrificantes por esterificação de ácidos graxos comerciais e álcool isoamílico utilizando como biocatalisador a formulação de lipase líquida Eversa Transform da Novozymes A/S, a qual foi especialmente formulada para a produção de biodiesel a partir de matéria lipídica com alta acidez livre. A partir de dados experimentais de rendimento em ésteres ou conversão de substrato com o tempo, bem como dados reportados na literatura para a síntese de ésteres a partir de ácidos graxos e DDOS (destilado da desodorização do óleo de soja), foram também realizados ajustes cinéticos para se determinar quais modelos se ajustam melhor a este tipo de reação (Michaelis-Menten clássico, Michaelis-Menten com inibição, Ping Pong Bi-Bi, etc.), permitindo-se dessa forma a obtenção de parâmetros cinéticos (V_{max} , K_m , K_i) e termodinâmicos (por exemplo, entalpia e energia de ativação). Também, determinou-se a especificidade dessa enzima por diferentes ácidos graxos, avaliando a sua afinidade com relação ao tamanho de cadeia e a presença de insaturações, em que ácidos saturados de cadeia média a longa apresentaram melhores conversões, como o ácido esteárico. Com relação ao solvente usado, o heptano se mostrou mais adequado. Também foram avaliados perfis de longa duração utilizando o ácido láurico (C12:0) e óleo de coco (majoritariamente contendo aproximadamente 70% de ácidos graxos saturados de cadeia média – C12:0-C16:0). Para o ácido láurico observou-se maior conversão no intervalo de 12 a 24 h, atingindo uma conversão máxima de 45%. Já para o óleo de coco, avaliou-se o rendimento dos ésteres isoamílicos, obtendo um rendimento menor que 3,5% ao final de 24 h de reação.

Palavras-chave: biolubrificantes, óleos vegetais, ácidos graxos, lipase.

ABSTRACT

Given the current scenario of energy transition, biolubricants are an interesting alternative to replace lubricating oils from fossil sources, which are the most used in the market to reduce friction effects between surfaces, among other several applications Biolubricants are composed of fatty acid esters that can be derived from biomass, such as vegetable oils, from transesterification reactions of oils or esterification of fatty acids with long linear and/or branched-chain alcohols. This work aimed at evaluating the enzymatic production of fatty acid esters for biolubricant bases by esterification of commercial fatty acids and isoamyl alcohol using as a biocatalyst a liquid lipase formulation from Novozymes A/S, Eversa Transform®, which was specially formulated to product biodiesel from lipid material with high free acidity. From experimental data of ester yield or substrate conversion over time, as well as data reported in the literature for the synthesis of esters from fatty acids and DDOS (distillate from the deodorization of soybean oil), kinetic modeling were made to determine which models best fit this type of reaction (classic Michaelis-Mentem, Michaelis-Menten with inhibition, Ping Pong Bi-Bi, etc.), thus allowing the obtaining of kinetic (such as V_{max} , K_m , K_I) and thermodynamic (enthalpy and activation energy) parameters. Also, the specificity of the enzyme for different fatty acids was determined, evaluating its affinity in relation to chain size and the presence of unsaturations, showing best results regarding to fatty acids of saturated medium-to-long chains, such as stearic acid. Regarding the solvent used, heptane proved to be more adequate. Conversion profiles over time using lauric acid (C12:0) and coconut oil (mostly composed of ca. 70% of medium-chain saturated fatty acids – C12:0-C16:0) were also evaluated. For lauric acid, a higher conversion was observed in the interval of 12 to 24 h, reaching a maximum conversion of 45%. For coconut oil, the yield of isoamyl esters was evaluated, obtaining a yield lower than 3.5% at the end of 24 h of reaction.

Keywords: biolubricants, vegetable oils, fatty acids, lipase.

SUMÁRIO

Banca Examinadora.....	i
Agradecimentos.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Tabelas.....	ix
1- INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1- Processo de refino dos óleos vegetais.....	3
2.1.1- Degomagem (1ª etapa).....	5
2.1.2- Neutralização (2ª etapa).....	5
2.1.3- Clarificação ou branqueamento (3ª etapa).....	6
2.1.4- Desodorização (4ª etapa).....	7
2.2- Óleos lubrificantes.....	8
2.2.1- Óleos base.....	10
2.2.2- Aditivos.....	12
2.3- Ésteres de ácidos graxos.....	15
2.3.1- Reações e catalisadores.....	17
2.4- Cinética e termodinâmica enzimática.....	22
2.4.1- Modelos cinéticos.....	23
2.4.2- Parâmetros termodinâmicos.....	26
3- METODOLOGIA.....	29
3.1- Ensaio de concentração de proteínas.....	29
3.2- Especificidade da enzima.....	29
3.3- Quantificação de ésteres por cromatografia gasosa.....	30

3.4- Quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa.....	30
3.5- Quantificação dos ácidos graxos no óleo de coco.....	30
3.6- Caracterização da massa molar dos substratos não convencionais.....	31
3.7- Determinação das velocidades de reação.....	31
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	33
4.1- Estudo da cinética enzimática.....	33
4.4.1- Primeiro estudo de caso.....	33
4.4.2- Segundo estudo de caso.....	36
4.4.3- Terceiro estudo de caso.....	40
4.2- Determinação da concentração de proteínas.....	44
4.3- Ensaio de especificidade da enzima.....	45
4.4- Ensaio de longa duração.....	47
5- CONCLUSÕES.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Etapa de degomagem do óleo vegetal.	5
Figura 2.2	Etapa de neutralização do óleo vegetal.	6
Figura 2.3	Etapa de branqueamento do óleo vegetal.	7
Figura 2.4	Etapa de desodorização do óleo vegetal.	8
Figura 2.5	Volume de vendas de lubrificantes em mercados brasileiros	10
Figura 2.6	Representação química dos óleos vegetais.	12
Figura 2.7	Reação de transesterificação.	17
Figura 2.8	Reação de esterificação.	18
Figura 2.9	Atuação da enzima na energia de ativação.	23
Figura 2.10	Etapas da reação de catálise enzimática com um substrato.	24
Figura 2.11	Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten.	24
Figura 2.12	Representação do modelo de Ping Pong Bi Bi.	25
Figura 2.13	Representação dos tipos de inibição reversível	26
Figura 2.14	Efeito da temperatura na velocidade de reação.	27
Figura 2.15	Efeito da temperatura na formação de produtos de uma reação.	28
Figura 4.1	Ajuste de Michaelis-Menten para a temperatura de 50°C e razões molares de biodiesel/álcool de (a) 1/1,5 e (b) 1/1,2 com $K_M = 228,8$ mol/L e $V_{m\acute{a}x} = 3$ mol/L/min.	34
Figura 4.2	Gráfico de linearização da equação de Arrhenius para obtenção da energia de ativação da reação.	35
Figura 4.3	Perfil de consumo do óleo de cozinha usado na reação de transesterificação com álcool isoamílico.	36
Figura 4.4	Ajuste polinomial de segunda ordem do perfil de concentração.	37
Figura 4.5	Gráfico de linearização da equação de Michaelis-Menten.	38

Figura 4.6	Curva de semelhança entre a velocidade ajustada e experimental.	39
Figura 4.7	Perfil de consumo dos reagentes ao longo da reação de transesterificação do DDOS.	41
Figura 4.8	Perfil de velocidade pela concentração do substrato.	42
Figura 4.9	Linearização de Lineweaver-Burk para os dados experimentais.	42
Figura 4.10	Curva de semelhança entre a velocidade ajustada e experimental.	43
Figura 4.11	Curva padrão para dosagem de proteínas pelo método de Bradford.	44
Figura 4.12	Perfil de concentração do ácido láurico ao longo da reação de esterificação com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:1 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e presença de peneira molecular.	48
Figura 4.13	Ajuste do modelo cinético Ping Pong Bi Bi para a reação de esterificação de ácido láurico com álcool isoamílico (40°C, razão molar 1:1 e 250 rpm de agitação, Eversa Transform (5%) líquida e presença de peneira molecular).	49
Figura 4.14	Figura 4.7 – Perfil de rendimento dos ésteres isoamílicos ao longo da reação de transesterificação de óleo de coco com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:6 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e sem presença de peneira molecular.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Atrativos e limitações para o mercado dos biolubrificantes.	16
Tabela 2.2	Vantagens e desvantagens dos tipos de catálises.	19
Tabela 2.3	Diferenças entre catálise homogênea e heterogênea.	21
Tabela 3.1	Teores dos tipos de ácidos graxos no óleo de coco.	31
Tabela 4.1	Energia de ativação e entalpia de ativação da reação.	35
Tabela 4.2	Condições de processo estabelecidas por Guimarães et al., 2021.	37
Tabela 4.3	Velocidades de reação calculadas pela derivação do polinômio.	38
Tabela 4.4	Parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten.	39
Tabela 4.5	Condições de processo estabelecidas por Araujo-Silva, 2022.	40
Tabela 4.6	Velocidades de reação calculadas.	41
Tabela 4.7	Parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten.	43
Tabela 4.8	Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano analisada por titulação ácido-base.	45
Tabela 4.9	Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano e DMSO analisada por titulação ácido-base.	46
Tabela 4.10	Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano analisada por GC.	46
Tabela 4.11	Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano e DMSO analisada por GC.	47
Tabela 4.12	Perfil de concentração e conversão do ácido láurico ao longo da reação de esterificação com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:1 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e presença de peneira molecular.	48
Tabela 4.13	Parâmetros cinéticos da reação do ácido láurico.	49

Tabela 4.14 Perfil de rendimento e concentração dos ésteres isoamílicos ao longo da reação de transesterificação de óleo de coco com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:6 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e sem presença de peneira molecular. 51

1. INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os combustíveis fósseis foram amplamente aproveitados pelos seres humanos nas mais diversas aplicações, entretanto, causaram efeitos negativos ao meio ambiente e à própria saúde humana, gerando um grande problema em escala global na atualidade. Assim, surgiu a necessidade do estudo de fontes alternativas de energia, em vista da conscientização cada vez maior acerca do desgaste do meio ambiente, aumento das demandas energéticas, mudanças climáticas e limitação das reservas disponíveis de petróleo (Islam *et al.*, 2023).

No setor de combustíveis e óleos lubrificantes, há atualmente uma grande preocupação com a substituição de recursos fósseis por biomassas renováveis e biodegradáveis como matérias-primas para a produção de combustíveis e derivados menos poluentes e renováveis. Dentre eles, destacam-se o biodiesel (Miranda *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2021) e os biolubrificantes (Sarma; Vinu, 2022; Bolina; Gomes; Mendes, 2021; Ahmad *et al.*, 2022; Perera *et al.*, 2022; Barbera *et al.*, 2022; Brêda *et al.*, 2022). E, para a produção destes, as enzimas (particularmente as lipases) têm um papel de destaque (Bolina; Gomes; Mendes, 2021).

Enzimas como biocatalisadores industriais oferecem inúmeras vantagens em relação aos processos químicos tradicionais com relação à sustentabilidade e eficiência do processo (Chapman *et al.*, 2018). Várias enzimas têm sido avaliadas e muitas delas aplicadas em diferentes setores industriais, tais como, alimentos, fármacos, cosméticos, detergentes, papel e celulose e combustíveis (Chapman *et al.*, 2018; Sheldon, R. A., 2019; DiCosimo *et al.*, 2013; Choi *et al.*, 2015; Wancura *et al.*, 2020; Monteiro *et al.*, 2021).

Dentre as várias enzimas aplicadas industrialmente, as lipases se destacam pela sua grande versatilidade quanto às reações catalisadas, a saber: hidrólise de óleos e gorduras em meio aquoso e esterificação, transesterificação (acidólise e alcoólise) e interesteriticação em meios com baixa atividade de água (Fernandez-Lafuente, 2010).

Óleos vegetais são bons substitutos dos lubrificantes à base de óleos minerais após sua conversão em ésteres alquílicos de ácidos graxos de cadeia longa (EAAGs), usando álcoois de cadeias lineares longas ou ramificadas (Mobarak *et al.*, 2014; Perera *et al.*, 2022). EAAGs contendo de 22 a 26 carbonos servem bem como componentes lubrificantes devido as suas adequadas propriedades físico-químicas, tais como, alto índice de viscosidade, lubricidade e estabilidade termo-oxidativa, baixa volatilidade e bom desempenho anti-desgaste mesmo a

baixas temperaturas (Zainal *et al.*, 2018; Ho; McAuley; Peppley, 2019; Cecilia *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2022).

A síntese enzimática de EAAGs é catalisada por lipases, as quais podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizada. Várias técnicas têm sido reportadas para a imobilização de enzimas, produzindo biocatalisadores estáveis operacionalmente, reutilizáveis e aplicáveis em diferentes configurações de reatores. Entretanto, em se tratando de biomoléculas produzidas em grande quantidade e com valor agregado baixo, como por exemplo biodiesel, o custo de imobilização pode impactar severamente no custo do produto. Assim, a utilização da enzima na forma livre parece ser a alternativa mais atrativa do ponto de vista industrial. Neste contexto, a Novozymes A/S lançou no mercado uma preparação líquida de lipase (Eversa Transform), derivada de uma cepa geneticamente modificada de *Thermomyces lanuginosus* e expressa em *Aspergillus oryzae*, especialmente formulada para a produção de biodiesel a partir de matéria lipídica com alta acidez livre (Monteiro *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2022). Essa enzima tem sido amplamente avaliada na produção de biodiesel metílico ou etílico a partir de diferentes matérias-primas lipídicas (Monteiro *et al.*, 2021; Wancura *et al.*, 2020). Entretanto, sua aplicação na produção de ésteres com propriedades lubrificantes é ainda escassa (Guimarães *et al.*, 2021; Araujo-Silva *et al.*; 2022)

Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a produção de ésteres com propriedades lubrificantes pela rota enzimática, usando Eversa Transform® como biocatalisador, a partir da esterificação de ácidos graxos e transesterificação de óleo vegetal com álcool isoamílico comercial (reações modelos). Paralelamente, realizou-se ajustes cinéticos a dados de conversão com o tempo reportados na literatura a fim de se determinar quais modelos se ajustam melhor à cinética de produção de ésteres bases para lubrificantes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Atualmente, a energia é essencial na vida dos seres humanos e tem um papel importante com relação à execução de atividades diárias e, inclusive, de impulsionar o crescimento econômico de uma nação. Em vista do aumento de industrialização e crescimento populacional, os combustíveis fósseis e derivados do petróleo vêm suprindo uma grande parcela da demanda global por energia há anos (Zainal et al., 2018).

Devido às previsões de esgotamento das reservas fósseis, o preço do petróleo e de seus derivados vêm crescendo rapidamente (Soni; Agarwal, 2014). Além disso, uma das grandes preocupações do século 21 é a redução dos impactos nocivos que o uso de derivados de origem fóssil tem causado ao meio ambiente. Neste contexto, atualmente, tem-se investido muito no desenvolvimento de produtos e processos para a geração de energia “limpa”, com destaque para a utilização de matérias-primas renováveis como substitutas para as de origem mineral (Syahir et al., 2017).

Os lubrificantes são utilizados extensamente para reduzir efeitos de atrito entre superfícies e podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, tais como, petróleo, óleos vegetais e gordura animal (Fernandes et al, 2021), e apesar do mercado de lubrificantes de origem renovável ter um grande potencial de crescimento, atualmente, apenas 2% do mercado global de lubrificantes é representado pelos biolubrificantes (Araujo-Silva *et al.*, 2022).

2.1. Processo de refino dos óleos vegetais

Óleos e gorduras, grupo inserido na classe dos lipídios que podem ter origem animal ou vegetal (Tiritan, 2020), são formados essencialmente por ácidos graxos e tiveram ampla aplicação desde a civilização egípcia até os tempos atuais, por exemplo como combustíveis líquidos para lamparinas, lubrificação e produção de sabões e tintas (Ramalho; Suarez, 2013).

Quimicamente, os óleos e gorduras são formados por ácidos graxos em sua forma livre ou combinada (ésteres). Os ésteres são formados por uma combinação entre um componente alcoólico e um componente ácido (ácidos carboxílicos de cadeia longa ou ácidos graxos), que são denominados monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos ou triacilglicerídeos (Ramalho; Suarez, 2013; Castro, 2014).

Diversos seres vegetais e animais acumulam óleos e gorduras em tecidos especializados e dada essa pluralidade de organismos que armazenam essas substâncias graxas, há diversas maneiras de se extrair e refinar os óleos vegetais e gorduras dependendo das características da fonte oleaginosa (Ramalho; Suarez, 2013).

Dentre as operações unitárias mais empregadas no processo de extração, destacam-se: prensagem mecânica, extração a solvente ou autoclavagem (Ramalho; Suarez, 2013). Então, posteriormente, os compostos passam pelo processo de refino ou purificação para ajustar as características do produto obtido, como melhorar odor, sabor e aparência, reduzir acidez e aumentar a estabilidade do composto pela remoção de componentes residuais (Tiritan, 2020).

A extração de óleos vegetais refere-se fundamentalmente a modificações de natureza física, ao passo que o refino ou purificação posterior dos óleos é, em sua maioria, atribuída às transformações químicas (Castro, 2014).

Inicialmente tem-se o processo de prensagem mecânica em que ocorre a passagem do vegetal em questão pelo equipamento de extração, separando-o em duas correntes, a torta (parte sólida decorrente da prensagem) e os óleos brutos (que podem ainda apresentar resíduos, e passam por um filtro-prensa para remover os sólidos restantes) (Ramalho; Suarez, 2013).

A torta é, então, encaminhada para a extração com solventes que pode ocorrer de duas maneiras: dissolução por contato com as células destruídas pela prensagem ou difusão, em que o óleo permeia, lentamente, as paredes semipermeáveis das células íntegras. Como resultado obtém-se a micela, uma solução saturada de óleo no solvente, que posteriormente passa por um evaporador para separar o óleo bruto do solvente (Ramalho; Suarez, 2013).

O óleo bruto é o óleo obtido dos processos de extração e geralmente possui diversos contaminantes, assim, é encaminhado para o estágio de refino para tornar os óleos brutos em óleos comestíveis (Tiritan, 2020).

O processo de refinamento consiste em quatro etapas principais: degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização. Cada passo é responsável por retirar uma parcela das impurezas e compostos indesejados presentes no óleo bruto de modo a alterar o mínimo possível os componentes desejados (Ferrari et al., 1996).

Pode-se, também, apresentar a etapa de “winterização”, que é responsável pela remoção de ceras (geralmente em óleos de milho e girassol), e ocorre após a neutralização. O processo consiste na precipitação das ceras em forma de cristais; inicialmente resfria-se o óleo a 6°C e o coloca em vasos cristalizadores, então, centrifuga-se a mistura separando os cristais do óleo winterizado que depois é lavado e secado (May, 1998).

Similarmente, é possível apresentar uma etapa de hidrogenação, em que ocorre o tratamento das gorduras com gás hidrogênio (com catalizador à base de níquel), processo em que ocorre a redução das insaturações dos ácidos graxos que compõem os óleos e isomerização das moléculas, assim melhorando a resistência à oxidação térmica e atmosférica (May, 1998).

2.1.1. Degomagem (1ª etapa)

A etapa de degomagem refere-se à remoção de fosfatídeos, proteínas e outras substâncias coloidais, chamadas gomas. No processo, adiciona-se de 1 a 3% de água ao óleo bruto, aquecendo levemente (70°C) por 20 a 30 min com agitação, assim, o material coloidal é hidratado formando emulsões. Centrifugando a mistura, obtêm-se uma parte aquosa com a lecitina do óleo (que pode ser comercializada) e o óleo degomado, o qual, por fim, passa por uma etapa de secagem sob vácuo (Figura 1) (Ramalho; Suarez, 2013; Oliveira, 2012). No caso de fosfolipídios insolúveis em água, é necessário, anteriormente realizar um tratamento com ácidos ou agentes quelantes como EDTA e, posteriormente, separar as gomas pela centrifugação (Tiritan, 2020).

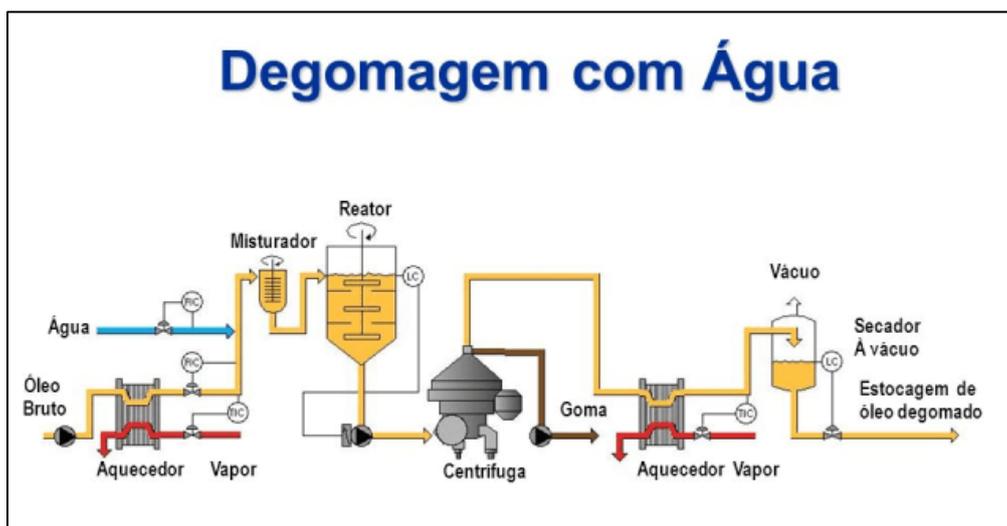


Figura 2.1 – Etapa de degomagem do óleo vegetal.

Fonte: adaptado de CARRIJO, 2019.

2.1.2. Neutralização (2ª etapa)

A etapa de neutralização é responsável por remover ácidos graxos livres, fosfolipídios e diversos compostos insaponificáveis. Durante o processo, inicialmente o óleo é aquecido e é adicionada uma pequena quantidade de ácido para o tratamento dos fosfolipídios não-hidratáveis (Oliveira, 2012). Em seguida, adiciona-se uma solução aquosa de álcalis (base ou

sal iônico de metais alcalinos ou alcalino terrosos), geralmente hidróxido de sódio (NaOH) diluído, ao óleo degomado, fazendo com que os ácidos graxos livres reajam formando sabões, também conhecidos como borras. Centrifugando ou sedimentando a mistura, separa-se a borra e o óleo, o qual passa por um processo de lavagem com água quente para remoção de qualquer resíduo de sabão restante e secagem a vácuo, obtendo, por fim o óleo neutralizado (Figura 2) (Tiritan, 2020; May, 1998; Ramalho; Suarez, 2013).

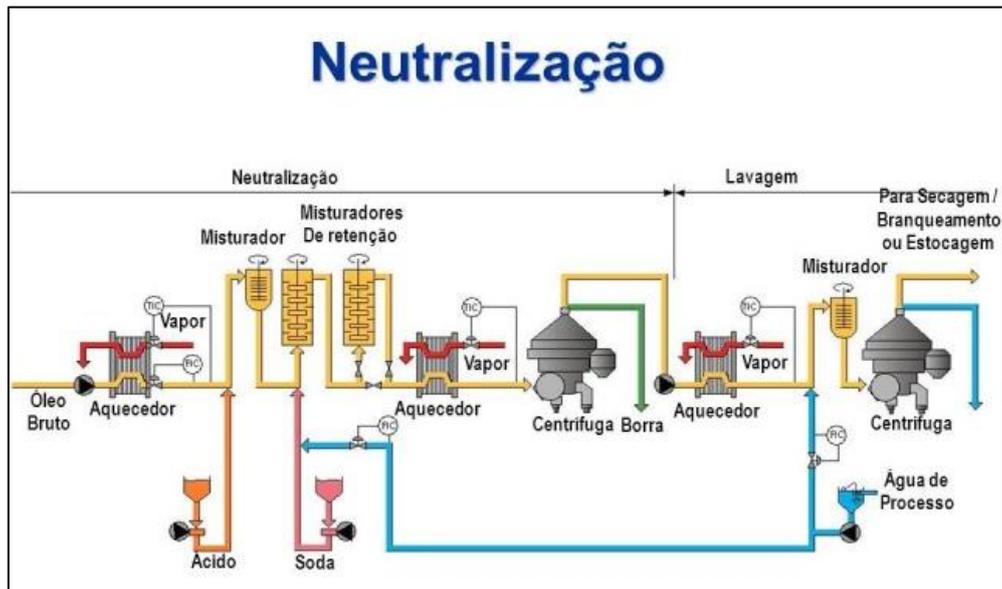


Figura 2.2 – Etapa de neutralização do óleo vegetal.

Fonte: adaptado de CARRIJO, 2019.

A borra é o resíduo mais predominante durante o processo de refino do óleo vegetal, ela é formada durante a etapa de neutralização e totaliza, em geral, de 5 a 10% da massa de óleo bruto, chegando a valores mais elevados caso o óleo possua alta concentração de ácidos graxos livres (Santos, 2012). Ela é composta por um alto conteúdo de ácidos graxos saponificados e possui baixo valor agregado devido sua grande disponibilidade. Por possuir alta concentração de ácidos graxos livres, esse composto pode ser utilizado como matéria lipídica para a produção de biodiesel e biolubrificantes (Araújo et al., 2016).

2.1.3. Clarificação ou branqueamento (3ª etapa)

O branqueamento é utilizado para a redução na quantidade de corantes naturais presentes no óleo. No processo, o óleo passa inicialmente por um processo de secagem para remoção de resquícios de água (aquecimento por 30 min a baixa pressão). Em seguida, o óleo é adicionado a uma mistura de carvão ativado, sílica e de argilas naturais (terra clarificante),

com massa em torno de 0,3 a 2 % em relação à massa de óleo alimentada, sob agitação, em que se adsorvem compostos solúveis que pigmentam o óleo, o que ocorre devido à atração, pela força de Van der Waals, entre as impurezas e os locais ativos no adsorvente (argila). Essa mistura passa por um filtro-prensa para retenção de partículas sólidas e recuperação do óleo clarificado (Figura 3) (Ramalho; Suarez, 2013; May, 1998; Tiritan, 2020).

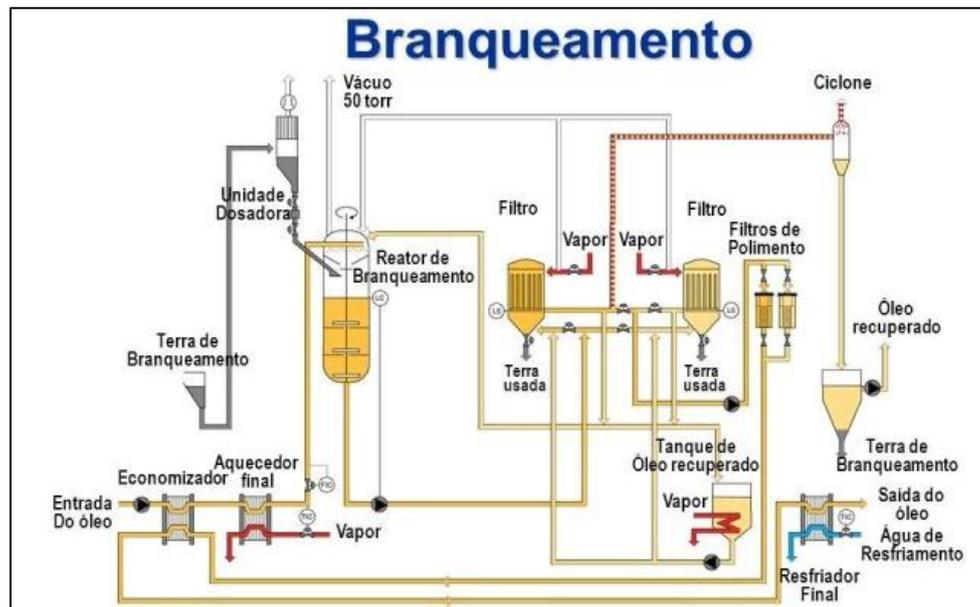


Figura 2.3 – Etapa de branqueamento do óleo vegetal.

Fonte: adaptado de CARRIJO, 2019.

2.1.4. Desodorização (4ª etapa)

A desodorização remove aldeídos, cetonas, ácidos graxos oxidados e tocoferol (vitamina E). No processo, o óleo clarificado passa pelo processo de arraste a vapor de água, em que o vapor é responsável por remover as substâncias que atribuem o odor ao óleo. Posteriormente, a separação é feita pelo processo de destilação fracionada que opera em alto vácuo (aproximadamente 0,004 atm) e temperaturas em torno de 250 °C (Figura 4) (May, 1998; Ramalho; Suarez, 2013).



Figura 2.4 – Etapa de desodorização do óleo vegetal.

Fonte: adaptado de CARRIJO, 2019.

O destilado da desodorização do óleo (DDO) também é um resíduo importante dessa indústria, constituído de 0,1% a 0,4% da massa do óleo original; atualmente ele é comercializado devido seu conteúdo de tocoferóis, 8% a 12%, que possui um elevado valor comercial pelas suas propriedades antioxidantes (Oliveira *et al.*, 2005). Além disso, o DDO possui elevada concentração de ácidos graxos livres (aproximadamente 34,0% a 37,0% m/m), podendo ser utilizado como matéria lipídica para conversão em ésteres alquílicos (biodiesel e biolubrificantes) (Aguieiras; Langone, 2013; Araujo-Silva *et al.*; 2022; Vieira *et al.*, 2021).

2.2. Óleos lubrificantes

Apesar de já serem utilizados, de certa maneira, desde tempos mais remotos, os óleos lubrificantes adquiriram um papel fundamental, especialmente após a Revolução Industrial (séc. XVIII), em que era de grande necessidade o bom funcionamento dos maquinários nas unidades fabris (Silva, 2011).

Com o aumento da importância do petróleo e expansão da indústria automobilística, os lubrificantes também ganharam maior notoriedade. Conseqüentemente, no século XX, as propriedades físico-químicas desses compostos começaram a ser estudadas, dando surgimento aos aditivos químicos e óleos sintéticos (Silva, 2011).

A lubrificação está inserida na área de estudo da tribologia, que consiste na ciência que estuda a interação de superfícies em movimento, e engloba como principais vertentes de estudo, assim como a lubrificação, o atrito e desgaste (Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

A lubrificação é utilizada extensamente para reduzir efeitos de atrito, desgaste, corrosão e transferência de calor entre superfícies, assim como aumentar a vida útil e durabilidade dos componentes e gerar economia energética. Os lubrificantes podem ser obtidos a partir de diferentes fontes, tais como, petróleo, óleos vegetais e gordura animal (Fernandes et al, 2021; Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013), sendo que cerca de 95% dos lubrificantes disponíveis no mercado são a base de petróleo, os quais são danosos ao meio ambiente, além de serem tóxicos e não renováveis (Syahir et al., 2017).

A gama de aplicação dos lubrificantes é extensa, incluindo uso em motores de combustão interna, engrenagens, compressores, turbinas, sistemas hidráulicos e outros. Eles podem ser separados em duas grandes categorias: lubrificantes automotivos e industriais (como graxas, óleos de corte, lubrificantes sólidos, etc.) (Matos, 2011).

Segundo dados publicados em Kline (2015), os lubrificantes são consumidos, preponderantemente, pelos setores automobilístico (cerca de 50%) e industrial (em torno de 40%), sendo que as regiões com mais demanda por esses produtos são a Ásia-Pacífico e América do Norte.

O mesmo estudo reportou que a demanda Mundial em 2015 ultrapassou a marca de 39 milhões de toneladas, com previsão de crescimento anual de 0,9% nos 5 anos seguintes devido, principalmente, ao aumento da demanda nas regiões da África e Oriente Médio, Ásia-Pacífico e América do Sul, respectivamente.

Em um estudo mais recente, em 2020, o Grand View Research avaliou o mercado em mais de 125 bilhões de dólares nesse ano, e ainda apontou um crescimento anual em 3,7% a partir de 2021, principalmente, devido à indústria automobilística. O relatório mostra dados do mercado mundial em 2019, trazendo os países mais influentes para o mercado dos lubrificantes, estando em primeiro lugar a China (7,3 milhões de toneladas), seguida dos EUA (6,05 milhões de toneladas), Índia (1,7 milhões de toneladas), Japão (1,35 milhões de toneladas), Rússia (1,3 milhões de toneladas), Brasil (1,1 milhões de toneladas), e Alemanha (1,0 milhão de toneladas).

No Brasil, segundo dados da ANP – Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, a produção nacional de lubrificantes ultrapassou a marca de 1,6 milhões de m³ em 2018. Em relação à comercialização desses produtos em mercados brasileiros nos últimos quatro anos, o volume vendido ultrapassou 1,3 milhões de m³ por ano, mantendo-se

relativamente estável. A Figura 2.5 apresenta o volume de venda de lubrificantes em mercados brasileiros de acordo com as regiões do país, entre 2019 e 2022.

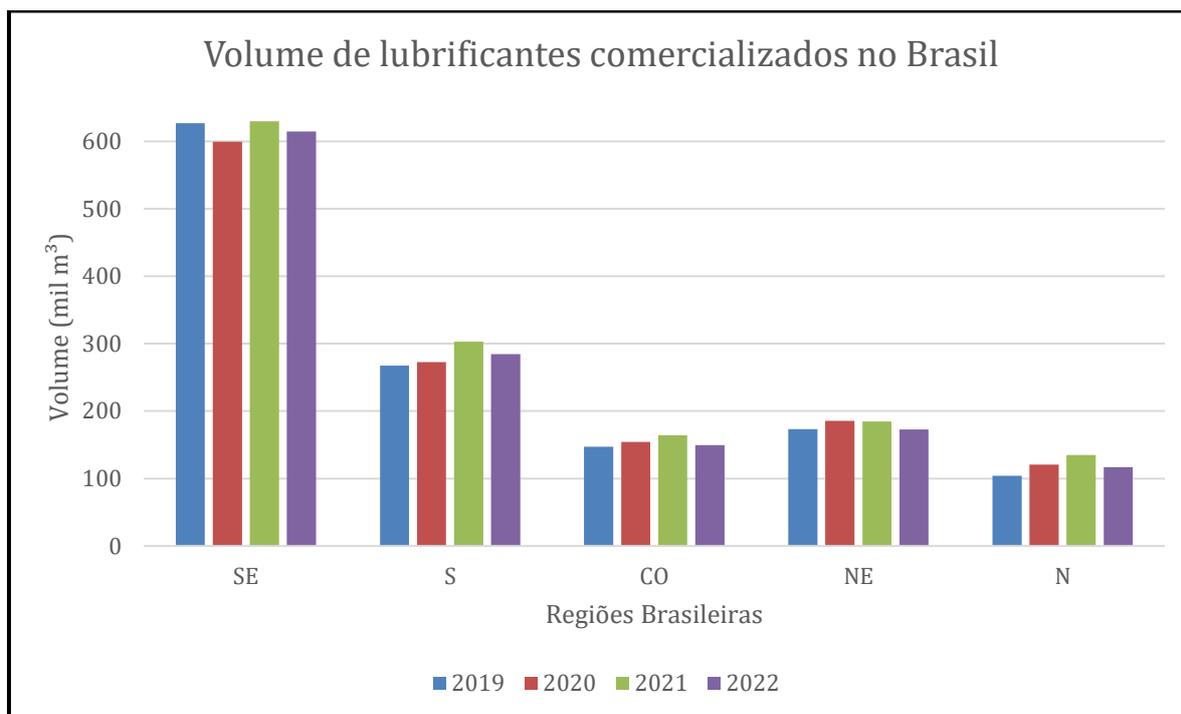


Figura 2.5 – Volume de vendas de lubrificantes em mercados brasileiros.

Fonte: adaptado de ANP.

2.2.1. Óleos base

Em questão da sua produção, os lubrificantes são formados por um processo simples, envolvendo a mistura de um ou mais óleos base e substâncias químicas que aumentam seu desempenho, os aditivos; entretanto, em casos específicos, outros processos químicos podem ser necessários, como para a produção de graxa em que se realiza a saponificação (Matos, 2011; Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

Os óleos bases são os principais componentes dos lubrificantes, com relação ao volume, uma vez que, em geral, compreendem 93% do volume total, juntamente com os aditivos químicos, com papel fundamental para melhorar o desempenho dos lubrificantes, que correspondem a 7% do volume total (Matos, 2011). A obtenção dos óleos base para lubrificantes pode ser feitas de três formas:

2.2.1.1. Petróleo

A extração dos óleos pode ocorrer pela rota do hidrorrefino (a partir de reações de hidrocrackeamento de frações do petróleo) ou pela rota convencional, a do solvente, em que, inicialmente, o petróleo passa por uma destilação atmosférica separando os combustíveis e gasóleos do resíduo não-destilado, que posteriormente passa por outra destilação a vácuo, para extrair os componentes mais pesados. Então, os óleos pesados obtidos passam por um processo de extração por solvente, de modo a extrair substâncias aromáticas indesejadas, permitindo a elevação do índice de viscosidade e melhoria da estabilidade oxidativa. Posteriormente, os óleos lubrificantes passam por um processo de desparafinação (abaixamento da temperatura para cristalização da maior parte das parafinas e remoção por filtração) e hidroacabamento para a retirada de compostos com nitrogênio, enxofre e oxigênio (Silva, 2011; Silva, 2012).

2.2.1.2. Sintetização

Os óleos bases para lubrificantes sintéticos são produzidos a partir de reagentes químicos, em sua maioria, derivados do petróleo; entretanto, por serem sintetizados em laboratório, há maior controle em sua composição, então o produto é praticamente livre de substâncias indesejadas ou contaminantes.

Esse tipo de lubrificante apresenta vantagens como, maior vida útil, melhores propriedades a baixas temperaturas, menor volatilidade, melhor índice de viscosidade, menor coeficiente de atrito e maior estabilidade térmica e oxidativa; contudo, apresenta desvantagens referentes a altos custos e incompatibilidade com certos aditivos (Silva, 2011; Silva, 2012; Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

As principais bases sintéticas são: polialfaolefinas, ésteres de ácidos carboxílicos, poliglicóis, poliisobutenos, aromáticos alquilados e polisiloxanos (Silva, 2011; Silva, 2012).

2.2.1.3. Óleos vegetais

Os óleos vegetais são formados pela condensação entre ácidos graxos e glicerol, formando triglicerídeos (Figura 2.6) que são os componentes predominantes. Possuem boa capacidade lubrificante, todavia apresentam complicações com relação à sua baixa estabilidade à oxidação e baixa estabilidade hidrolítica, propriedades a baixa temperatura ruins, e tendência de formar lodo (Mobarak *et al.*, 2014). Portanto, de modo a contornar esses problemas, tem-se

como alternativa a adição de aditivos aos óleos ou modificação por meio de reações químicas, alterando sua composição (Silva, 2011).

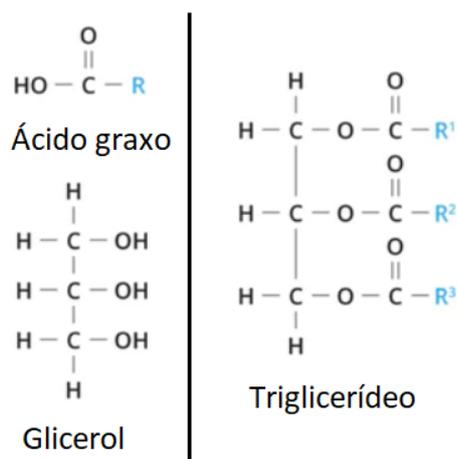


Figura 2.6 – Representação química dos óleos vegetais.

Fonte: adaptado de MATOS, 2011.

O uso de óleos vegetais para produção de lubrificantes vem sendo estudado há anos, porém as propostas não obtiveram grandes impactos devido à grande disponibilidade e baixo custo de óleos lubrificantes produzidos a partir do petróleo. Entretanto, o interesse por substitutos de derivados do petróleo tem se elevado devido à necessidade iminente de frear os impactos negativos que o uso dessas matérias-primas fósseis tem causado ao meio ambiente (Zainal et al., 2018).

2.2.2. Aditivos

Os aditivos, em geral, são compostos sintéticos, caracterizados de acordo com a sua finalidade e com o objetivo de melhorar as características dos óleos básicos e potencializar novas qualidades que eles não possuem. Os aditivos podem ser identificados como: detergentes-dispersantes, antioxidantes, melhoradores do índice de viscosidade, antiferrugem, biocidas, redutores do ponto de fluidez, antidesgaste, antiespumantes, anticorrosivo, agentes de aderência, emulsificantes, desemulsificantes, agentes antivazamento, entre outros (Matos, 2011; Guimarães, 2006; Pauli; Uliana, 1997; Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

2.2.2.1. Antioxidantes

Os aditivos antioxidantes são utilizados em lubrificantes destinados a diversas aplicações como motores de combustão interna, turbinas, compressores, motores elétricos, fusos, sistemas hidráulicos, sistemas de circulação de óleo e outros (Pauli; Uliana, 1997).

Dependendo de modos de extração, refino e natureza dos óleos básicos, há uma variação na capacidade antioxidante dessas substâncias; além disso, fatores como contaminação e calor podem interferir na velocidade de oxidação do óleo, logo utiliza-se o aditivo para melhorar essa propriedade (Pauli; Uliana, 1997).

A oxidação tem produtos que comprometem as funções, como aumento de acidez e viscosidade, e a vida útil do óleo e posteriormente podem danificar até o maquinário que está sendo lubrificado, pela corrosão das peças lubrificadas (Matos, 2011).

Esse tipo de aditivo pode ser separado em duas classes: antioxidantes primários (inibidores da geração de radicais orgânicos) e secundários (decompositores de peróxidos) e são, geralmente, compostos fenólicos e aminas aromáticas estericamente impedidas (Matos, 2011; Silva, 2011).

2.2.2.2. Detergentes e dispersantes

Esses tipos de aditivos são destinados ao uso em motores de combustão interna e têm como função a solubilização de fragmentos contaminantes no óleo, envolvendo cada partícula do resíduo em uma camada protetora, evitando a formação de acúmulos sólidos de produtos da oxidação oriundos do processo de combustão em motores de diesel e gasolina (Silva, 2011; Pauli; Uliana, 1997).

Os aditivos detergentes, que têm por função manter as superfícies metálicas limpas, são formados por longas cadeias de hidrocarbonetos com grupos polares nas extremidades, em geral, sais fosfonatos e sulfonatos, que apresentam boas propriedades anticorrosivas. No caso dos dispersantes, os quais têm como objetivo dispersar a matéria sólida, é comum o uso de metais que formam sabões básicos, tais como cálcio e magnésio, fazendo com que produtos ácidos sejam neutralizados e dispersados (Silva, 2011; Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

2.2.2.3. Inibidores de ferrugem

Os aditivos antiferrugem são utilizados em óleos protetivos, turbinas, sistemas hidráulicos, compressores, motores de combustão interna, sistemas de circulação de óleo etc.,

tendo como principal finalidade evitar a corrosão de metais ferrosos pela ação de água e umidade (Pauli; Uliana, 1997).

Eles agem de maneira a formar uma película na superfície metálica, repelindo o ataque da água e outros químicos. Esses aditivos também atuam reduzindo a oxidação e a formação de agentes corrosivos (ácidos). São compostos, em geral, formados por sulfonatos de metal e alquilbenzeno (Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

2.2.2.4. Melhoradores de índice de viscosidade

A variação de viscosidade pela variação de temperatura é um efeito comum em lubrificantes, os quais se tornam mais viscosos com a diminuição da temperatura e menos viscosos quando aquecidos (Silva, 2011). Para auxiliar nesse fenômeno, os aditivos melhoradores do índice de viscosidade reduzem a variação da viscosidade dos óleos em função da variação de temperatura e são utilizados em lubrificantes para motores de combustão interna (Pauli; Uliana, 1997).

O seu funcionamento gira em torno do fato de que com o aumento da temperatura os aditivos conseguem ser mais solubilizados no óleo, formandoovelos que dilatam e aumentam a viscosidade do lubrificante (Silva, 2011).

Esses tipos de aditivos podem ser formados por diversos tipos de polímeros que apresentam essa propriedade, tais como copolímeros de olefinas, copolímero de estireno e butadieno, sendo os mais utilizados os polimetacrilatos (Guimarães, 2006).

2.2.2.5. Antiespumantes

Espumas podem ser formadas pela agitação do óleo e, por aumentarem o contato com o ar, agilizam a decomposição dos óleos, também podendo modificar certas propriedades da lubrificação (Silva, 2011; Pauli; Uliana, 1997).

Os aditivos antiespumantes atuam reduzindo a tensão superficial, facilitando as bolhas de ar de se separarem do óleo, assim evitando a formação de espuma estável que comprometa o lubrificante (Guimarães, 2006).

Para impedir sua formação, podem ser utilizados aditivos à base de silicones líquidos, entretanto, por serem insolúveis têm a tendência de se separarem do óleo (Silva, 2011).

2.2.2.6. Extrema Pressão e Modificadores de Fricção

Ambos fazem parte da categoria de aditivos antidesgaste e são geralmente substâncias que contêm diofosfato de zinco, enxofre ou fósforo. Eles atuam formando uma camada de filme protetora que diminui o desgaste provocado pelo atrito (Silva, 2011).

Os aditivos de extrema pressão são aplicados em óleos para transmissões automotivas, óleos para mancais ou engrenagens industriais que trabalham com excesso de carga e óleos de corte. Em alta pressão, a película de óleo lubrificante pode ser rompida por conta de um efeito de deslizamento excessivo, desse modo, o aditivo de extrema pressão reage com a superfície metálica formando uma película lubrificante que reduzirá o desgaste (Pauli; Uliana, 1997).

Os aditivos modificadores de fricção provocam adsorção física e podem ser utilizados para operações em pressões baixas a moderadas, como motores de combustão interna e sistemas hidráulicos (Silva, 2011; Pauli; Uliana, 1997).

2.3. Ésteres de ácidos graxos

Os biolubrificantes referem-se a lubrificantes derivados de produtos obtidos por biomassa, como óleos vegetais, ou gorduras animais e outros hidrocarbonetos não danosos ambientalmente (Syahir et al., 2017). Os óleos vegetais brutos possuem estruturas semelhantes aos hidrocarbonetos de cadeia longa obtidos a partir do petróleo, além de possuírem origem renovável, logo consistem em bons candidatos na síntese de biolubrificantes (Fernandes et al, 2021).

O uso de bases vegetais biodegradáveis em lubrificantes possui vantagens em relação às bases minerais, entre elas, destaca-se a biodegradabilidade, renovabilidade, boas propriedades, como, alto índice de viscosidade, ponto de fulgor, lubricidade, são bons solventes para aditivos, apresentam baixa volatilidade em decorrência da alta massa molar etc., além de apresentarem menor custo se comparadas a bases sintéticas (García-Zapateiro et al, 2013).

As principais moléculas presentes nos biolubrificantes são ésteres, os quais podem ser obtidos a partir de reações entre os óleos vegetais ou outros ésteres com álcoois (de cadeias lineares longas e ramificadas) de modo a favorecer as propriedades lubrificantes (Silva et al, 2015).

Nessas reações, os álcoois utilizados, frequentemente, são álcoois poli-hidroxílicos, ou seja, que apresentam mais de uma hidroxila na cadeia. Entre eles, o trimetilolpropano (TMP), pentaeritritol (PET) ou neopentilglicol (NPG) são os mais utilizados, uma vez que têm cadeias

longas, ramificações, ligações duplas e grupos hidroxila, os quais influenciam largamente nas propriedades biolubrificantes (Silva et al, 2015).

Embora apresentem vantagens, os biolubrificantes ainda possuem desafios a serem ultrapassados, que envolvem desde falta de incentivo governamental, até seu desempenho (Syahir et al., 2017). Especialmente lubrificantes obtidos a partir de óleos vegetais possuem baixa estabilidade oxidativa, térmica e hidrolítica, assim como propriedades ruins, como ponto de fluidez, a baixa temperatura. Entretanto, já foi observado que realizando modificações químicas adequadas e utilizando aditivos pode-se melhorar a estabilidade oxidativa e ponto de fluidez desses compostos (García-Zapateiro et al, 2013).

Ainda assim, outros fatores devem ser levados em consideração, evidenciando os principais atrativos para o desenvolvimento dessa área e as limitações que apresentam, como descrito na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Atrativos e limitações para o mercado dos biolubrificantes.

Atrativos	Limitações
<ul style="list-style-type: none"> • Aceitação geral • Aumento do preço de óleos fósseis • Benefícios ambientais • Selos sustentáveis • Necessidade de inovação • Avanços na biotecnologia 	<ul style="list-style-type: none"> • Desempenho • Qualidade da matéria-prima • Conversão por biocatálise da biomassa • Investimento (nas áreas rurais e de desenvolvimento em pesquisas e tecnologia) • Custo final

Fonte: adaptado de BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2013.

O desempenho, investimento, custo, aceitação industrial e do público consumidor, e sustentabilidade são as principais barreiras e propulsores para o crescimento do mercado dos biolubrificantes. A aceitação do produto pelos consumidores, governos e empresas de modo a levantar a importância do desenvolvimento dos produtos a partir de biomassa é essencial. Nações como França, Alemanha e Brasil promovem e desenvolvem ativamente as áreas de produtos renováveis (Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

O custo é um grande fator na implementação dos biolubrificantes. A substituição de lubrificantes minerais por biolubrificantes só ocorrerá caso sejam economicamente favoráveis,

levando em consideração os seus benefícios e diferenças em relação aos outros produtos no mercado (Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

Com relação aos desafios de desempenho, podem-se destacar as propriedades ruins à baixa temperatura e os problemas de estabilidade oxidativa dos óleos vegetais brutos. Foi reportado que a partir de -10°C os óleos passam por solidificação e não são capazes de fluir. Por parte da estabilidade de oxidação, as cadeias alquílicas de ácidos graxos são muito suscetíveis à oxidação, gerando produtos que alteram diretamente a viscosidade dos óleos, aumentando-a, e a formação de ácidos graxos livres, também, causa aceleração de efeitos corrosivos nas superfícies metálicas (Syahir et al., 2017).

Existe, também, dificuldade de obtenção de matérias-primas homogêneas em larga escala, assim há variação entre os óleos obtidos, o que leva o produto final a ter propriedades insatisfatórias. Juntamente, a maioria das matérias-primas plantadas mundialmente são de biomassas comestíveis, o que pode desbalancear a oferta de alimento em detrimento da alta utilização para produção de biolubrificantes (Syahir et al., 2017).

No que diz respeito à tecnologia, a evolução da produção de biolubrificantes também encontra como barreira a necessidade de desenvolver aditivos renováveis, que diferem dos utilizados em produtos à base de petróleo, e de biocatalisadores de maior eficiência em processos industriais (Bart; Gucciardi; Cavallaro, 2013).

2.3.1. Reações e catalisadores

Para obtenção de ésteres de ácidos graxos com propriedades lubrificantes a partir de óleos vegetais (triglicerídeos) e álcoois, tem-se como possibilidade as reações de transesterificação (Figura 2.7). Esse tipo de mecanismo quebra a molécula dos óleos utilizando um álcool na presença de catalisadores, de modo a formar os ésteres e glicerina como subproduto (Silva, 2012; Keera; Sabagh; Taman, 2011).

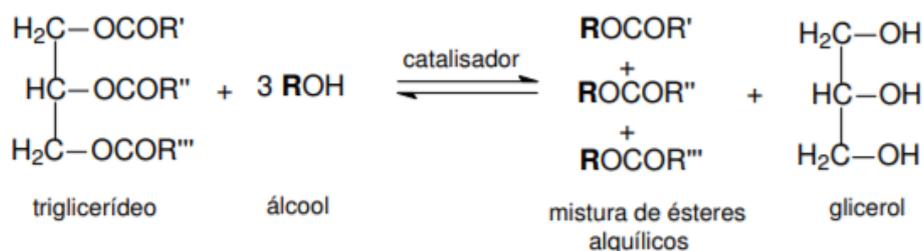


Figura 2.7 – Reação de transesterificação.

Fonte: adaptado de SCHUCHARDT; SERCHELI; VARGAS, 1998.

A reação, como um todo, é o conjunto de três reações reversíveis consecutivas, em que mono e diglicerídeos são formados como intermediários. A estequiometria da reação exige 3 mols de álcool para cada 1 de triglicerídeo, entretanto, por ser uma reação reversível, é de costume que o álcool seja adicionado em excesso proporcionando o deslocamento do equilíbrio para maior conversão dos produtos e para auxiliar na separação do glicerol formado (Schuchardt; Sercheli; Vargas, 1998).

Outra reação possível é a de esterificação, quando a matéria-prima possui ácidos graxos livres em sua composição. É possível observar essa reação na Figura 2.8.

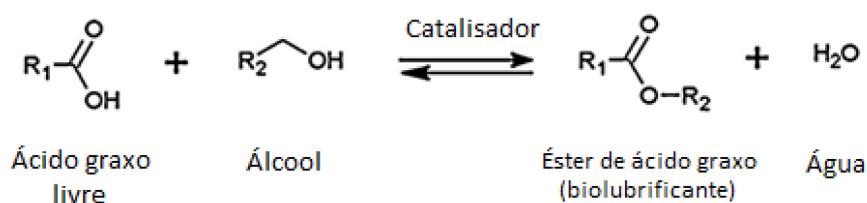


Figura 2.8 – Reação de esterificação.

Fonte: adaptado de HAIGH et al., 2014.

A transesterificação ou esterificação pode ser catalisada por três classes de catalisadores: homogêneos, heterogêneos e enzimáticos (podem pertencer aos homogêneos ou heterogêneos dependendo da mobilidade da enzima) (Helwani *et al.*, 2009). No caso dos homogêneos, destacam-se como catalisadores bases (comumente NaOH e KOH) e ácidos (usualmente ácido sulfúrico, sulfônico e clorídrico) (Keera; Sabagh; Taman, 2011). Em relação aos catalisadores heterogêneos, destacam-se sólidos ácidos ou básicos, compostos de metais alcalino terrosos, polímeros orgânicos, enzimas imobilizadas, entre outros (Verziu *et al.*; 2011; Helwani *et al.*, 2009).

A Tabela 2.2 apresenta um resumo dos principais exemplos de catalisadores, e suas vantagens e desvantagens.

Tabela 2.2 – Vantagens e desvantagens dos tipos de catálises.

Catálise	Exemplos	Vantagens	Desvantagens
Básica homogênea	NaOH, KOH	Alta atividade catalítica, baixo custo e cinética favorável (baixo tempo de reação)	Requer baixa quantidade de ácidos graxos livres e condições anidras, saponificação, formação de emulsão, mais gasto de água na purificação
Básica heterogênea	CaO, CaTiO ₃ , CaMnO ₃ , Ca ₂ Fe ₂ O ₇ , KOH/NaY	Não corrosiva, reciclável, tempo de vida mais longo, maior seletividade, fácil separação, não agride o meio ambiente	Requer baixa quantidade de ácidos graxos livres e condições anidras, mais gasto de água na purificação, alto custo, requer maior razão molar álcool/óleo
Ácida homogênea	H ₂ SO ₄ , HCl	Não forma sabões, permite óleos com alta concentração de ácidos graxos livres, catalisa esterificação e transesterificação simultaneamente	Corrosão de equipamentos, dificuldade de reciclar, maior temperatura e tempo de reação, baixa atividade catalítica
Ácida heterogênea	ZnO/I ₂ , TiO ₂ /SO ₄ ²⁻ , zircônia sulfatada	Catalisa esterificação e transesterificação simultaneamente, não agride o meio ambiente, reciclável	Limitação de difusão, alto custo, baixa microporosidade
Enzimática	lipase B de <i>Candida antarctica</i> , lipase de <i>Candida rugosa</i>	Não forma sabões, não poluí, mais fácil de purificar, condições de operação modestas	Preços elevados

Fonte: adaptado de LEUNG; WU; LEUNG, 2010 e HELWANI *et al.*, 2009.

2.3.1.1. Catálise homogênea básica

Esse processo foi reportado com a utilização de catalisadores de hidróxidos de metais alcalinos, como sódio e potássio, obtendo alta atividade catalítica e maior efetividade em relação à catálise ácida (Helwani *et al.*, 2009; Ganesan; Rajendran; Thangavelu, 2009).

A reação de transesterificação pode ocorrer em pressão atmosférica e temperatura em torno de 60-70 °C, entretanto, a maior limitação da catálise básica se encontra na quantidade de água e ácidos graxos livres presentes no meio reacional e no óleo utilizado. A presença de água pode favorecer a reação de hidrólise dos triglicerídeos, gerando uma maior concentração de ácidos graxos livres, que por sua vez reagem com o catalisador formando sabões, o que consome parte do catalisador e forma emulsões que dificultam a separação dos ésteres de ácidos graxos do glicerol (Ganesan; Rajendran; Thangavelu, 2009; Helwani *et al.*, 2009).

Para óleos e gorduras com grande quantidade de ácidos graxos livres, pode ser realizada uma etapa de pré-tratamento catalisado por ácidos, para a transformação desses ácidos graxos em ésteres e, posteriormente, completar a transesterificação utilizando a catálise básica (Meher; Vidyasagar; Naik, 2006)

2.3.1.2. Catálise homogênea ácida

Na transesterificação catalítica usando catalisador ácido homogêneo, a reação pode ser catalisada por diversos ácidos como sulfúrico, fosfórico, clorídrico ou ácidos sulfônicos. Com relação às condições de operação desses casos, utiliza-se pressões e temperaturas de baixas a moderadas, altas razões molares entre álcool e óleo (para obtenção de bons rendimentos em tempos razoáveis de reação), além de altas concentrações dos ácidos (Helwani *et al.*, 2009; Meher; Vidyasagar; Naik, 2006).

Esse tipo de catálise é mais indicado em casos de óleos com altos teores de ácidos graxos livres e água, assim, se tornando atrativo pela não formação dos sabões. Entretanto, esses catalisadores são pouco utilizados em vista de sua taxa de reação ser relativamente lenta, apesar de ser aplicável em casos específicos dependendo das matérias-primas (Helwani *et al.*, 2009; Meher; Vidyasagar; Naik, 2006).

2.3.1.3. Catálise heterogênea

O uso de catalisadores heterogêneos vem sendo estudado e desenvolvido principalmente na transesterificação de óleos com alto índice de ácidos graxos livres (Ganesan;

Rajendran; Thangavelu, 2009). A Tabela 2.3 apresenta as principais diferenças entre as catálises homogêneas e heterogêneas.

Tabela 2.3 – Diferenças entre catálise homogênea e heterogênea.

Fatores	Catálise homogênea	Catálise heterogênea
Taxa de reação	Rápida com altas conversões	Conversão moderada
Operações <i>downstream</i>	Não há recuperação do catalisador e os resíduos devem ser neutralizados	Pode-se recuperar o catalizador
Custo	Mais elevado devido a necessidade de mais etapas de purificação	Potencial de ser mais barata

Fonte: adaptado de HELWANI *et al.*, 2009.

Catalisadores ácidos sólidos têm grande potencial para substituir a utilização dos catalisadores ácidos homogêneos, uma vez que reduzem a corrosão aos equipamentos, evitam problemas ambientais e eliminam uma etapa de separação (Ganesan; Rajendran; Thangavelu, 2009). Apesar disso, a exploração do uso desses compostos os mostra limitados com relação a ocorrências de reações adversas e baixas taxas de reação (Helwani *et al.*, 2009).

As maiores dificuldades, atualmente, ocorrem devido a restrições de difusão do catalisador (difícil obter uma arquitetura dos poros uniforme e com controle absoluto sobre a geometria dos poros). Em meio a isso, as zeólitas parecem ter maior potencial por conta da sua estrutura uniforme de poros, entretanto é necessária uma superfície hidrofóbica para a adsorção dos óleos ser favorável e para evitar a desativação de sítios catalíticos pela adsorção de subprodutos polares como glicerol ou água (Helwani *et al.*, 2009).

Com relação à catálise heterogênea básica, podem ser utilizados como catalisadores zeólitas básicas, hidrotalcitas, óxidos de metais alcalinos terrosos ou sais de metais alcalinos suportados em meios porosos (Leung; Wu; Leung, 2010).

Entre os óxidos de metais alcalinos terrosos, os mais promissores são os derivados de cálcio em vista do baixo custo, menor toxicidade e baixa solubilidade em álcoois. Entretanto, como CaO exibe baixa atividade na transesterificação, a incorporação de lítio ao catalisador aumenta a força do mesmo (Helwani *et al.*, 2009).

Ainda assim, a catálise heterogênea básica exige um baixo teor de ácidos graxos livres e água, razão molar elevada de álcool/óleo, altas temperaturas e pressões para reação, além de possuírem um custo mais elevado e limitações de difusão (Leung; Wu; Leung, 2010).

2.3.1.4. Catálise enzimática

Tipicamente, para catálise enzimática das reações de transesterificação são utilizadas lipases, sendo o rendimento dos ésteres variável de acordo com a enzima utilizada (Helwani et al., 2009). Além disso, as lipases não requerem coenzimas, são razoavelmente estáveis e geralmente tem boa tolerância a solventes orgânicos (Schuchardt; Sercheli; Vargas, 1998).

Os catalisadores enzimáticos adquiriram maior atratividade em anos recentes, pois podem evitar formação de sabão e deixam o processo de purificação mais simples. No entanto, eles são menos utilizados comercialmente devido aos tempos de reação mais longos e o custo mais elevado (Leung; Wu; Leung, 2010).

Em caso de catálise enzimática, o tempo de reação é usualmente muito mais longo que os de catálise homogênea básica. Apesar disso, evita-se as desvantagens de alta necessidade energética, necessidade de tratamento dos resíduos e dificuldade de separação do glicerol ao final, além das demandas de baixos teores de água e de ácidos graxos livres (Helwani *et al.*, 2009; Islam *et al.*, 2023).

As lipases são capazes de catalisar a reação de transesterificação tanto em sistemas aquosos quanto em meios não aquosos, sendo capazes de converter completamente os ácidos graxos livres em ésteres (Meher; Vidyasagar; Naik, 2006). Apesar da alta especificidade, condições de operação modestas (baixas temperaturas para impedir a degradação das proteínas que compõe a enzima) e baixo impacto ambiental, o grande impedimento para esse tipo de catalisador é o alto custo (Helwani *et al.*, 2009). Desse modo, a concentração do biocatalisador (lipase) necessária para a execução adequada do processo de conversão é crucial do ponto de vista industrial e econômico (Islam *et al.*, 2023).

2.4. Cinética e termodinâmica enzimática

O estudo cinético é uma das ferramentas mais importantes para a análise de qualquer reação química. Tal estudo engloba a verificação da influência do meio reacional e de parâmetros termodinâmicos, como temperatura e pressão, nas velocidades de transformação dos reagentes em produtos (Pinto; Menezes, 2009).

Frequentemente, o desafio encontrado na construção de estudos cinéticos está relacionado com a determinação das sequências de eventos que ocorrem de modo que a transformação reacional ocorra. No caso de reações catalisadas por enzimas, grande parte do conhecimento

acerca dos mecanismos de atuação desses catalisadores é proveniente de estudos cinéticos (Pinto; Menezes, 2009).

Enzimas são proteínas e podem agir como catalisadores de diversas reações químicas, e são classificadas em uma gama de classes, sendo elas oxirredutases, transferases, hidrolases, isomerases e ligases (Pacheco; Mendes, 2021).

As propriedades catalisadoras de enzimas atuam de modo a diminuir a energia de ativação necessária para que o substrato seja convertido em produtos, como demonstrado na Figura 2.9, assim aumentando a velocidade das reações (Pacheco; Mendes, 2021).

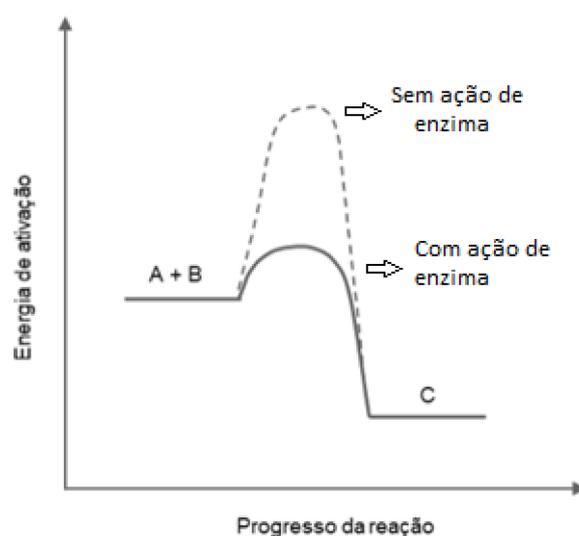


Figura 2.9 – Atuação da enzima na energia de ativação.

Fonte: adaptado de PACHECO; MENDES, 2021.

Quando uma reação é catalisada por uma enzima, ela se processa em duas etapas. Na primeira etapa ocorre uma ligação reversível entre a enzima (E) e o substrato (S) formando um complexo enzima-substrato (ES), enquanto na segunda etapa o produto formado é liberado, regenerando a enzima que então consegue se ligar a outra molécula de substrato (Alves, 2016).

2.4.1. Modelos cinéticos

Pode-se relacionar a efetividade da ação da enzima para catalisar a reação com medidas de velocidade de reação, sendo de geração de produto ou consumo de substrato por tempo (Pacheco; Mendes, 2021).

Um dos modelos mais clássicos estabelecidos é a Teoria de Michaelis-Menten (Modelo Uni Uni sem reação reversa) que considera um único substrato (Pinto; Menezes, 2009). O

modelo propõe que a enzima e o substrato reagem rapidamente para formar o complexo ES, de modo que a etapa limitante é a de formação de produto, além disso considera um excesso de substrato (Alves, 2016).

Assim, é possível determinar, a partir da reação descrita na Figura 2.10, a equação do Modelo de Michaelis-Menten, demonstrada pela Equação 2.1.

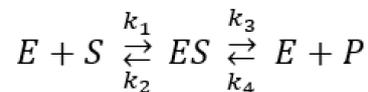


Figura 2.10 – Etapas da reação de catálise enzimática com um substrato.

Fonte: adaptado de ALVES, 2016.

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S]} \quad (\text{Equação 2.1})$$

Em que v_0 é a velocidade inicial da reação, $v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima da reação, $[S]$ é a concentração de substrato, K_M é a constante de Michaelis-Menten.

A constante de Michaelis-Menten (K_M) representa a concentração do substrato onde se obtém metade da velocidade máxima da reação. Graficamente, pode-se representar a Equação 2.1 pela Figura 2.11.

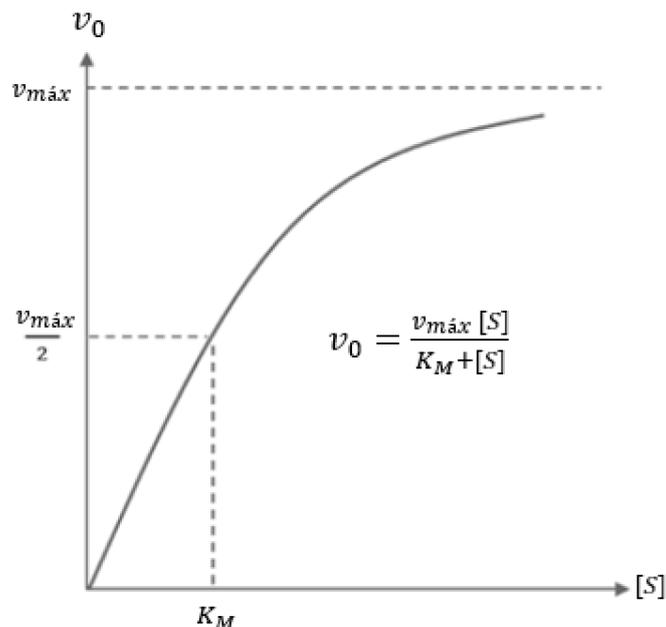


Figura 2.11 – Representação gráfica da equação de Michaelis-Menten.

Fonte: adaptado de PACHECO; MENDES, 2021.

Outro modelo cinético muito estudado para reações de transesterificação é o Ping Pong Bi Bi, que considera a presença de dois substratos. O mecanismo de reação considerado por esse modelo está representado na Figura 2.12, em que inicialmente a lipase (E) adsorve o primeiro substrato A (doador acil = ácido graxo ou triglicerídeo) para formar um complexo não covalente EA, o qual é transformado em um intermediário acil-lipase (F), liberando o primeiro produto P (água, se for usado ácido graxo ou diacilglicerídeos, se forem usados triglicerídeos) (Haigh et al., 2014).

Então, o intermediário acil-lipase (F) se liga ao segundo substrato B (álcool de cadeia longa) formando um complexo FB que é transformado a lipase-produto 2 (EQ), liberando em seguida o produto desejado Q e regenerando a enzima E (Haigh et al., 2014).

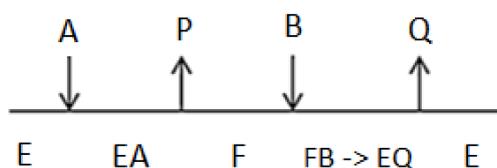


Figura 2.12 – Representação do modelo de Ping Pong Bi Bi.

Fonte: adaptado de HAIGH et al., 2014.

A partir do mecanismo exemplificado na Figura 2.12 é possível equacionar o modelo de Ping Pong Bi Bi (Equação 2.2), em que v_0 é a velocidade inicial da reação, $v_{máx}$ é a velocidade máxima da reação, $[A]$ e $[B]$ são as concentrações dos substratos A e B e K_{MA} e K_{MB} são as constantes de afinidade da enzima pelos substratos A e B (Hajar; Vahabzadeh, 2014).

$$v_0 = \frac{v_{máx} [A][B]}{[B]K_{MA} + [A]K_{MB} + [A][B]} \quad \text{(Equação 2.2)}$$

Outros modelos muito utilizados são os que consideram a inibição da reação. Existem dois tipos principais de inibidores enzimáticos: reversíveis e irreversíveis. Na inibição irreversível, a atividade enzimática é inativada definitivamente, de modo que a substância inibidora se une à enzima por ligações covalentes, o que altera o grupo funcional da enzima necessário para sua atividade catalítica, tornando-a inativa de forma permanente (Batista, 2015; Martins, 2015).

Na inibição reversível, as moléculas do inibidor e as moléculas da enzima se unem por ligações não covalentes, que por serem mais instáveis podem ser rompidas, fazendo com que

a enzima retome a sua atividade posteriormente. A inibição reversível é subdividida em três classes de inibidores: competitivos, incompetitivos e não-competitivos (Batista, 2015; Borges, 2023).

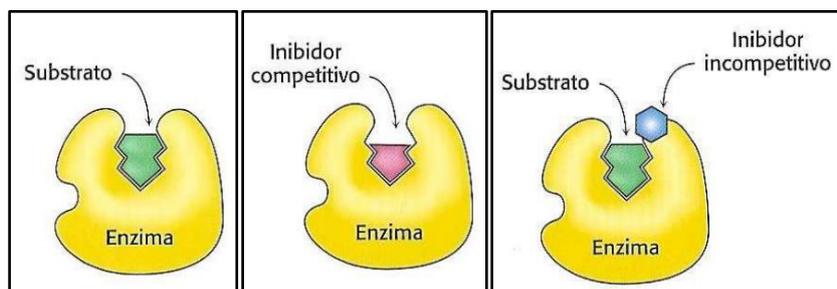


Figura 2.13 – Representação dos tipos de inibição reversível.

Fonte: adaptado de BORGES, 2023.

Na inibição competitiva, os inibidores competitivos são substâncias que concorrem diretamente com o substrato específico da enzima. As moléculas desses inibidores têm uma estrutura muito parecida com a do substrato da enzima e, por isso, se unem reversivelmente às enzimas, formando um complexo enzima-inibidor muito semelhante ao complexo enzima-substrato. Por não haver a formação do complexo enzima-substrato, a atividade catalítica da enzima é inibida enquanto existir o complexo enzima-inibidor (Asqui; Demera; Palacios, 2022; Borges, 2023).

Os inibidores incompetitivos são os que interagem com os complexos enzima-substrato pré-formados, impedindo a formação de produtos e, portanto, diminuindo a velocidade da reação. Nesse tipo de inibição, o inibidor interage com a enzima em um sítio diferente do substrato, assim a adição de maiores quantidades de substrato não contribui para que o efeito inibitório seja reduzido (Borges, 2023).

Pode-se descrever os modelos de Michaelis-Menten com inibição competitiva e incompetitiva através das Equações 2.3 e 2.4 respectivamente.

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [S]}{K_M \alpha + [S]} \quad (\text{Equação 2.3})$$

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [S]}{K_M + [S] \alpha} \quad (\text{Equação 2.4})$$

Em que, a equação 2.5 pode ser utilizada para descrever o parâmetro α .

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad (\text{Equação 2.5})$$

Também é possível incorporar inibições ao modelo de Ping Pong Bi Bi (Magalhães, 2010), como demonstra a Equação 2.6, em que α_B representa os efeitos de inibição do álcool e α_A os do óleo.

$$v_0 = \frac{v_{m\acute{a}x} [A][B]}{[B]K_{M_A}\alpha_B + [A]K_{M_B}\alpha_A + [A][B]} \quad (\text{Equação 2.6})$$

2.4.2. Parâmetros termodinâmicos

A temperatura é um parâmetro de grande influência na atividade catalítica das enzimas, que influencia as velocidades específicas das etapas elementares das reações (Pinto; Menezes, 2009). Em condições de estabilidade térmica, a curva de influência da temperatura na velocidade de reação pode ser representada pela Figura 2.14.

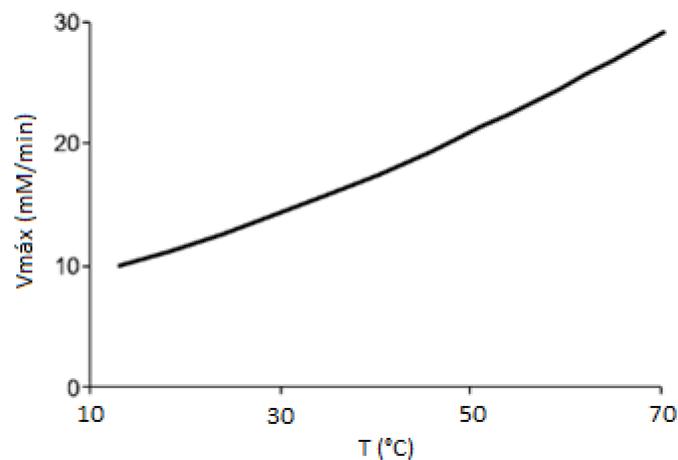


Figura 2.14 – Efeito da temperatura na velocidade de reação.

Fonte: adaptado de PINTO; MENEZES, 2009.

Essa influência, que afeta diretamente a velocidade de reação, obedece a Lei de Arrhenius (Pacheco; Mendes, 2021). A versão linearizada da equação de Arrhenius modificada está descrita na Equação 2.7.

$$\ln(v_{m\acute{a}x}) = \ln(A_0) + \left(\frac{-E_a}{R}\right) \left(\frac{1}{T}\right) \quad (\text{Equação 2.7})$$

Em que $v_{m\acute{a}x}$ é a velocidade máxima da reação, E_a é a energia de ativação (que determina a mínima energia necessária que os reagentes devem possuir para que a reação ocorra), R a constante dos gases ideais (8,314 J/mol.K) e T a temperatura.

Até certo ponto, o aumento da temperatura se mostra favorável para aumentar a velocidade da reação. Entretanto, no caso da catálise enzimática, se tratando de uma molécula de proteína como catalisador, a elevação da temperatura também aumenta as chances de desativação térmica ou desnaturação da enzima (Pacheco; Mendes, 2021; Pinto; Menezes, 2009).

A Figura 2.15 representa bem os efeitos antagônicos que a temperatura exerce sobre a atividade enzimática. Nota-se que em temperaturas relativamente baixas, em que não se observa efeito de desnaturação, ocorre um aumento da velocidade catalítica (maior formação de produto no tempo) com o aumento da temperatura do meio, entretanto, a partir de 50 °C a velocidade da reação começa a decair, por conta da ocorrência de inativação das moléculas e consequente diminuição da concentração de enzimas ativas no meio reacional.

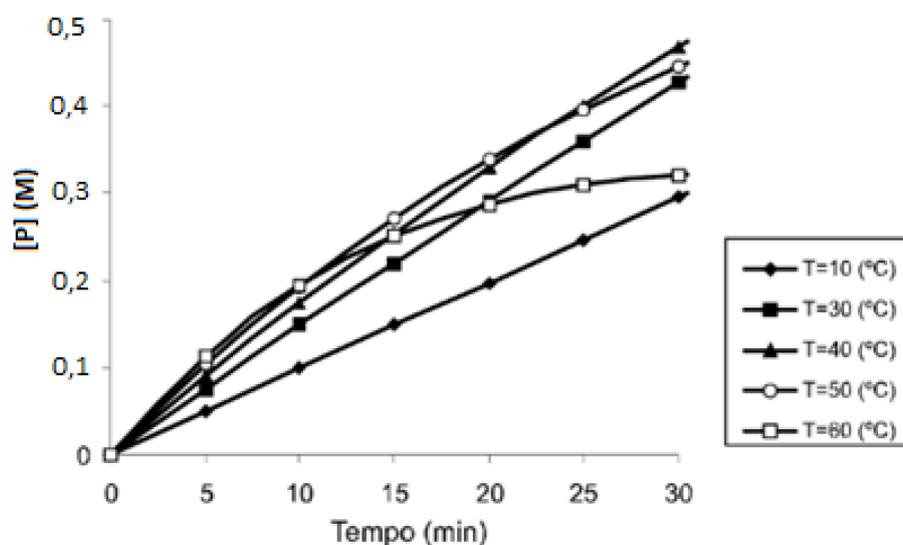


Figura 2.15 – Efeito da temperatura na formação de produtos de uma reação.

Fonte: adaptado de PINTO; MENEZES, 2009.

A partir da energia de ativação da reação, pode-se obter a entalpia de ativação, utilizando a Equação 2.8.

$$\Delta H^* = E_a - RT \quad (\text{Equação 2.8})$$

3. METODOLOGIA

Neste projeto de pesquisa foram utilizadas metodologias já implementadas no Laboratório de Tecnologia Enzimática (LabEnz) do DEQ/UFSCar, tais como, determinação de proteínas pelo método de Bradford, determinação de acidez por titulação ácido-base e determinação de ácidos carboxílicos e ésteres por cromatografia gasosa. Todos os reagentes usados eram de grau analítico e foram usados sem nenhum tratamento.

3.1. Ensaios de concentração de proteínas

A concentração de proteína na lipase líquida comercial Eversa Transform (Novozymes, Bagsvaerd, Dinamarca) foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) utilizando como proteína padrão a albumina de soro bovino (BSA, Sigma-Aldrich, St. Loius, MO, EUA).

3.2. Especificidade da enzima

As reações de esterificação entre ácidos carboxílicos comerciais (butírico, láurico, palmítico, esteárico, oleico e linoleico; Sigma-Aldrich, St. Loius, MO, EUA) e álcool isoamílico (Êxodo Científica, Sumaré, SP, Brasil) tinha por finalidade avaliar a afinidade da enzima frente a ácidos carboxílicos de diferentes comprimentos de cadeia (C4 a C18), tanto saturadas quanto insaturadas. As reações foram conduzidas a 40°C, razão molar ácido:álcool de 1:1, 250 rpm em Shaker, usando 5% de enzima líquida (massa de enzima/massa de ácido graxo), na ausência de peneira molecular. Dois solventes foram avaliados na solubilização dos ácidos carboxílicos (0,1 M), a saber, heptano e mistura de heptano/DMSO (razão 3/2, v/v). As conversões da reação foram calculadas inicialmente a partir do consumo de ácido por titulação ácido-base usando fenolftaleína como indicador e, posteriormente, por cromatografia gasosa. Posteriormente, a conversão de ácido láurico (C12:0, Sigma-Aldrich, St. Loius, MO, EUA) na reação de esterificação com álcool isoamílico foi monitorada com o tempo, conduzindo a reação nas mesmas condições descritas anteriormente, exceto que aqui foi utilizada peneira molecular (tipo 3 Å, Fluka, Charlotte, NC, EUA) como agente dessecante (adicionando 1 g de peneira para cada 0,22 g de água formada pela reação).

Também, avaliou-se o rendimento em ésteres isoamílicos com o tempo na reação de transesterificação de óleo de coco (Copra Indústria Alimentícia Ltda, Maceio, AL, Brasil) com álcool isoamílico. A reação foi conduzida a 40°C, razão molar óleo:álcool de 1:6, 250 rpm em Shaker e 5% de enzima, usando heptano como solvente, na ausência de peneira molecular.

3.3. Quantificação de ésteres por cromatografia gasosa

Ésteres de ácidos graxos foram quantificados por cromatografia gasosa conforme descrito em Guimarães *et al.* (2021). Utilizou-se cromatógrafo Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EUA) equipado com um Detector de Ionização por Chama (FID) e coluna capilar Rtx-Wax (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Restek Corporation, Bellefonte, PA, EUA). O injetor e detector foram fixados em 250°C e a coluna em 210°C. Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 0,5 mL/min, razão split de 1:50 e 25 min de análise. Heptadecanoato de metila (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi usado como padrão interno. Uma massa de 50 mg da amostra, lavada e seca, foi dissolvida em 1 mL da solução interna padrão (10 mg/mL em heptano) e 1 μL foi injetado no equipamento. A partir disso, pôde-se calcular o rendimento mássico de éster pela Equação 3.1.

$$\text{Rendimento de ésteres (\%)} = \frac{(\Sigma A) - A_{SI}}{A_{SI}} \times \frac{C_{SI} \times V_{SI}}{m} \times 100 \quad (\text{Equação 3.1})$$

Em que, ΣA é a área total de picos de ésteres de ácidos graxos C14:0 até C24:0, A_{SI} é a área de pico do padrão interno (C17), C_{SI} é a concentração do padrão interno (10 mg/mL), V_{SI} é o volume da solução padrão interna (1 mL) e m é a massa da amostra (50 mg).

3.4. Quantificação de ácidos graxos por cromatografia gasosa

As concentrações de ácidos carboxílicos foram determinadas por cromatografia gasosa em um cromatógrafo a gás Agilent 7890A (Santa Clara, CA, EUA), equipado com detector de ionização por chama (FID) e coluna Restek Rtx-wax (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm; Resteck Corporation, Bellefonte, PA, EUA), mantida a 200°C por 1 min, 230°C por 1 min (10°C/min) e 250° C por 5 min (5°C/min). Hélio foi usado como gás de arraste a uma vazão de 1,8 mL/min, com tempo de corrida de 14 min. As concentrações de ácidos eram calculadas a partir de curvas padrões (relações lineares entre área cromatográfica e concentração).

3.5. Quantificação dos ácidos graxos no óleo de coco

Para determinação do teor de ácidos graxos no óleo de coco utilizado, aplicou-se os próprios percentuais fornecidos pelo fabricante no rótulo do produto (óleo de coco da Copra Alimentos), apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Teores dos tipos de ácidos graxos no óleo de coco.

Ácidos	Cadeia carbônica	Teores, % mássica
Capróico	C6:0	0,44%
Caprílico	C8:0	6,15%
Cáprico	C10:0	5,01%
Láurico	C12:0	42,01%
Mirístico	C14:0	17,38%
Palmítico	C16:0	9,30%
Esteárico	C18:0	3,15%
Oleico	C18:1	7,14%
Linoleico	C18:2	1,79%

Fonte: Arquivo pessoal.

3.6. Caracterização da massa molar dos substratos não convencionais

Para determinação da massa molar do DDOS (Cocamar, Maringá, PR, Brasil) e do óleo de cozinha usado, utilizou-se do método a partir do índice de saponificação (I.S.). O índice de saponificação é uma importante caracterização para entendimento da qualidade e pureza dos óleos, e refere-se à quantidade de hidróxido de potássio (KOH) em miligramas necessária para saponificar um grama de óleo (Araújo, 2016).

Assim, é possível determinar a massa molar média dos triglicerídeos presentes no óleo através da equação 3.2, e utilizando a estequiometria das reações pode-se determinar as massas molares dos di- e monoglicerídeos, assim como a dos ácidos graxos livres.

$$MM_{triglicerideos}^{média} = \frac{3000 MM_{KOH}}{I.S.} \quad (\text{Equação 3.2})$$

3.7. Determinação das velocidades de reação

O cálculo das velocidades de reação é feito através da diferenciação da curva de concentração do reagente limitante pelo tempo, sendo possível calcular essa derivada por métodos numéricos ou gráficos. Três abordagens podem ser utilizadas para determinar a

derivada: diferenciação gráfica, diferenciação do polinômio ajustado aos dados e aplicação de fórmulas de diferenciação numérica (FOGLER, 2014).

Quando os dados são adquiridos experimentalmente, geralmente é mais vantajoso realizar um ajuste de curva polinomial e, em seguida, derivar o polinômio resultante. A diferenciação numérica é preferencialmente evitada devido às complexidades de execução (SILVA, 2019).

É crucial exercer cautela ao escolher o grau do polinômio de ajuste. Para graus baixos, o polinômio de ajuste não refletirá adequadamente os efeitos dos dados e não passará por muitos pontos. Por outro lado, ao optar por graus mais elevados, a curva de ajuste pode exibir muitos máximos e mínimos ao tentar ajustar-se aos dados experimentais, resultando em erros significativos (FOGLER, 2014).

Nesse trabalho optou-se pela diferenciação através de ajustes polinomiais de segunda ordem, executados na função gráfica do Excel.

4. RESULTADOS

O projeto foi separado em quatro etapas, sendo elas um estudo cinético com base em dados obtidos na literatura, determinação da concentração de proteínas através do método de Bradford, ensaios para determinação da especificidade da lipase Eversa Transform por ácidos carboxílicos de cadeias médias a longas, saturadas e insaturadas, e ensaios de longa duração (reações de esterificação de ácido láurico com álcool isoamílico e reações de transesterificação de óleo de coco com álcool isoamílico).

4.1. Estudo da cinética enzimática

O trabalho foi iniciado com um estudo cinético da síntese enzimática de biolubrificante devido à escassez de modelos e parâmetros cinéticos na literatura para esse tipo de reação.

4.1.1. Primeiro estudo de caso

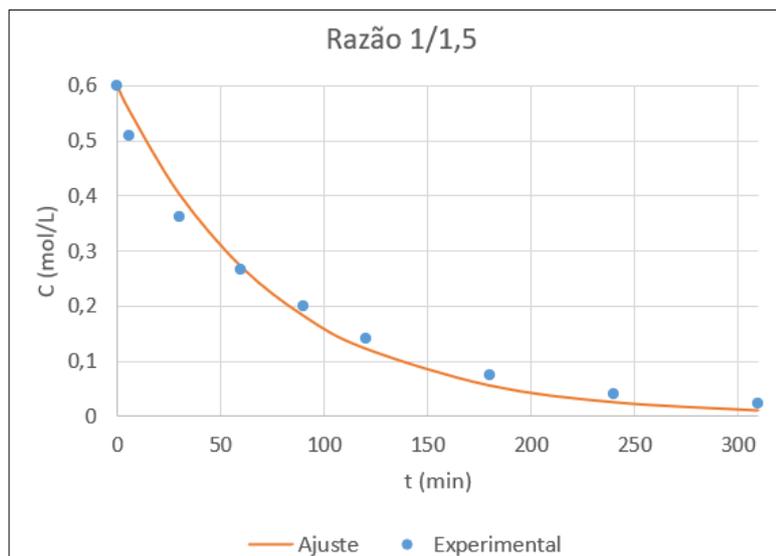
Para este primeiro caso, tomou-se como base os dados experimentais de produção de biolubrificante reportados por Kleinaité e colaboradores (Kleinaité et al., 2014). Neste trabalho, os autores reportam resultados de reações de transesterificação com biodiesel de óleo de canola (doador de grupos acil) e 2-etil-1-hexanol (álcool, em excesso) utilizando a mesma enzima que se utilizou na parte experimental deste projeto (lipase de *Thermomyces lanuginosus*), porém na forma imobilizada, podendo servir como uma comparação para os futuros resultados obtidos nas atividades laboratoriais utilizando a enzima na forma líquida (enzima livre).

Inicialmente, foi utilizado o programa ‘GetData Graph Digitizer’ para coletar os valores reportados nos ensaios de longa duração do artigo que estavam apresentados na forma de gráficos de conversão por tempo. Em seguida, a partir dos dados extraídos, iniciou-se um estudo cinético da reação, levando em consideração dois modelos sem inibição, o clássico de Michaelis-Menten (Equação 2.1) e o Ping Pong Bi Bi (Equação 2.2).

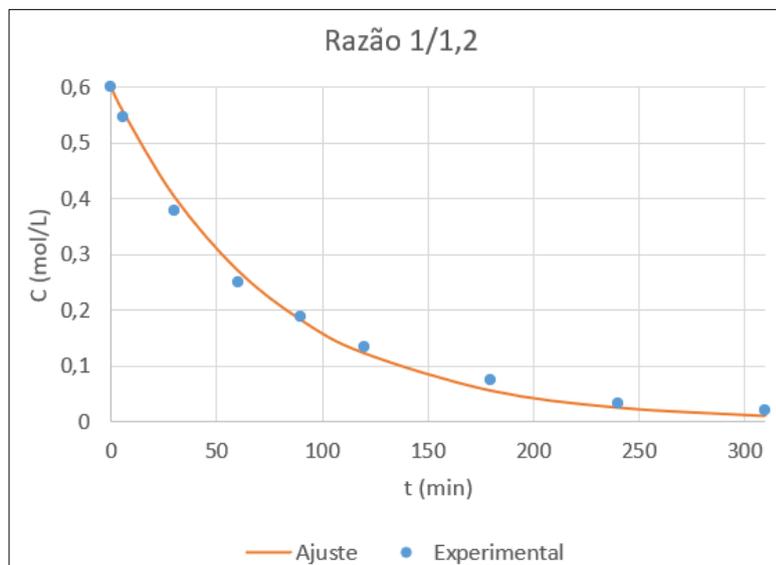
Para obter os valores dos parâmetros cinéticos, foi inicialmente utilizada a ferramenta Solver no Excel, entretanto não foi possível obter os valores dos parâmetros de ambos os modelos para bons ajustes aos dados experimentais. Portanto, seguiu-se para uma abordagem diferente utilizando um código com o método de Marquardt (MARQUARDT, 1963) no software de programação Fortran, utilizando primeiramente o modelo de Ping Pong Bi Bi em que obteve-se bons valores para $v_{m\acute{a}x}$ e K_{MA} (do biodiesel), porém o valor de K_{MB} (do álcool)

foi muito pequeno, o que sinalizou que provavelmente a reação se adequaria ao modelo de Michaelis-Menten.

Logo, aplicando o modelo de Michaelis-Menten ao Fortran, considerando o substrato A (nesse caso o biodiesel) como o reagente limitante, obteve-se valores de K_M da ordem de 230 mol/L e $v_{m\acute{a}x}$ no intervalo de 1,2 a 3 mol/L/min, dependendo da temperatura de reação, que permitiram um bom ajuste do modelo aos dados experimentais. A Figuras 4.1 apresenta os ajustes obtidos para o modelo de Michaelis-Menten para duas razões molares de biodiesel/álcool.



(a)



(b)

Figura 4.1 – Ajuste de Michaelis-Menten para a temperatura de 50°C e razões molares de biodiesel/álcool de (a) 1/1,5 e (b) 1/1,2 com $K_M = 228,8$ mol/L e $V_{m\acute{a}x} = 3$ mol/L/min.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos valores de velocidade máxima obtidos em diferentes temperaturas e utilizando a versão linearizada da equação de Arrhenius modificada (Equação 2.7) foi possível obter a energia de ativação (E_a) da reação de transesterificação enzimática pela inclinação da reta obtida (Figura 4.2). Assim, a partir da energia de ativação, obteve-se a variação de entalpia de ativação da reação, descrita pela Equação 2.8. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.1.

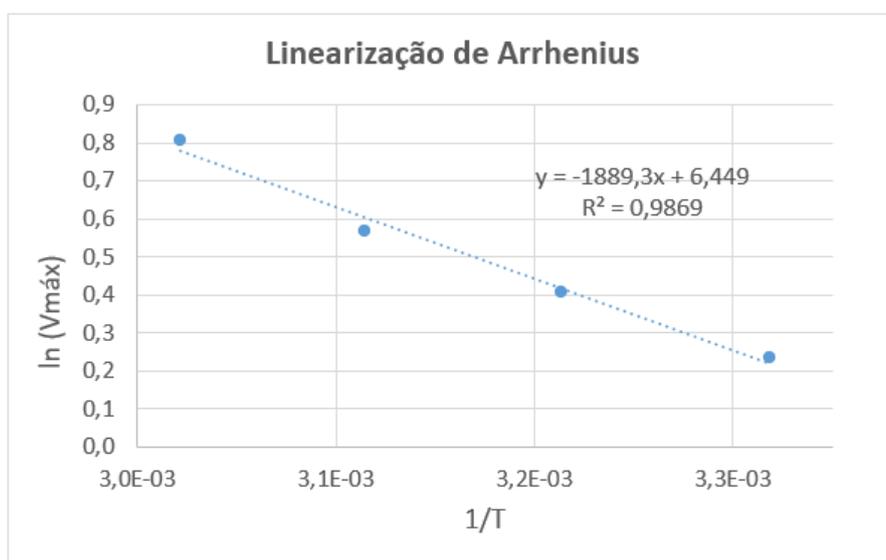


Figura 4.2 – Gráfico de linearização da equação de Arrhenius para obtenção da energia de ativação da reação.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.1 – Energia de ativação e entalpia de ativação da reação.

E_a (kJ/mol)	157,05
ΔH^* (kJ/mol)	154,50

Fonte: Arquivo pessoal.

Nessa etapa, foi perceptível que os ajustes cinéticos por Michaelis-Menten se adequaram bem aos pontos experimentais descritos no artigo utilizado, sendo assim, um ajuste eficiente para a cinética da enzima.

A equação de Arrhenius na forma linearizada também apresentou um bom ajuste com relação à equação de reta obtida através da regressão linear, demonstrando que o modelo utilizado foi adequado.

4.1.2. Segundo estudo de caso

Para o segundo caso, os dados experimentais de produção de biolubrificante utilizados foram reportados por Guimarães e colaboradores (Guimarães *et al.*, 2021). Nesse trabalho, os autores estudaram a reação de transesterificação do óleo de cozinha usado com álcool isoamílico, investigando a catálise com a lipase Eversa Transform® imobilizada pela técnica CLEA (Cross-Linked Enzyme Aggregates).

Os dados de concentração molar dos reagentes ao longo do tempo foram obtidos a partir dos dados publicados de rendimento de ésteres no tempo e o índice de saponificação da matéria-prima, em que, para um sistema e análise sem perdas, a conversão do óleo foi considerada o próprio rendimento. Em seguida, com dados extraídos, iniciou-se um estudo cinético da reação, levando em consideração os modelos cinéticos apresentados no Tópico 2.4.

A condição de processo estudada está descrita na Tabela 4.2. A Figura 4.3 representa o perfil da concentração do óleo de cozinha usado nas condições avaliadas.

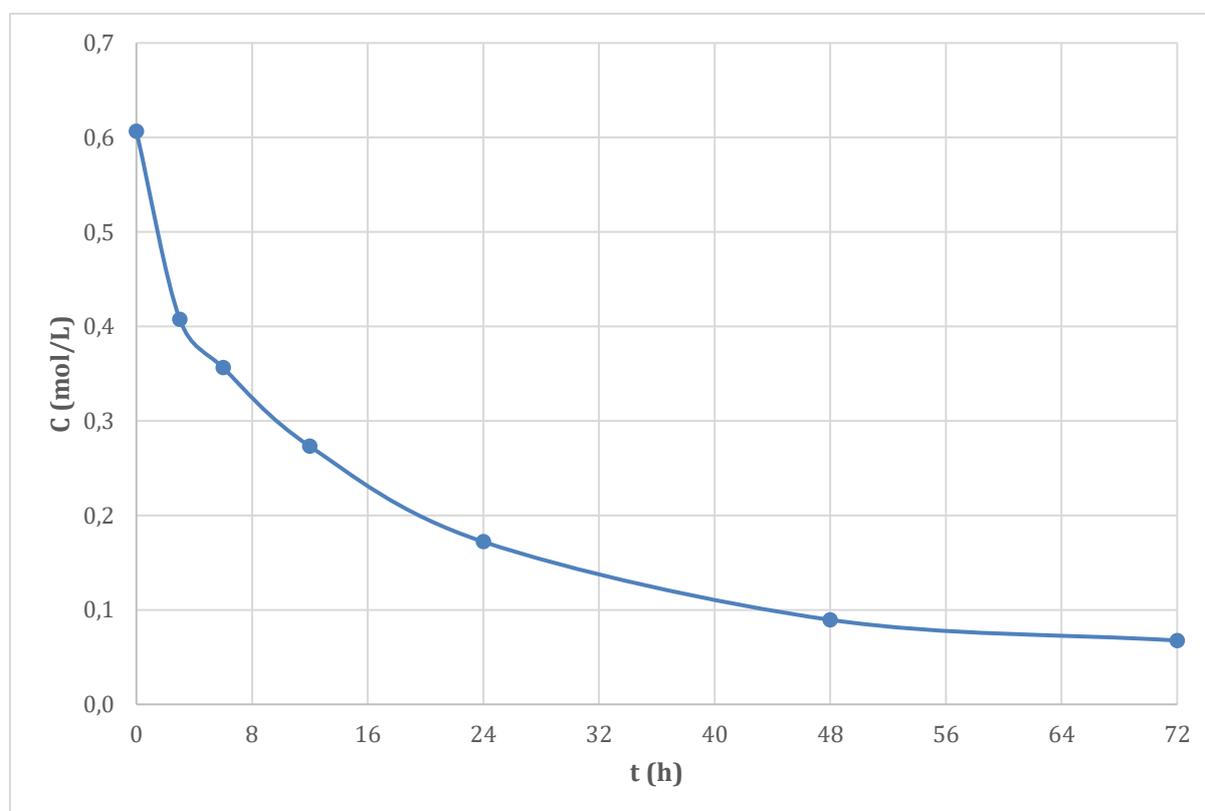


Figura 4.3 – Perfil de consumo do óleo de cozinha usado na reação de transesterificação com álcool isoamílico.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.2 – Condições de processo estabelecidas por Guimarães *et al.*, 2021.

Propriedades	Condição
Razão molar Óleo/Álcool	1:6
Temperatura (°C)	40
Agitação (rpm)	1500-1750
Enzima	Eversa-mCLEA
Carga enzimática (U_{est}/g óleo)	12

Fonte: Adaptado de Guimarães *et al.*, 2021.

Inicialmente, realizou-se o ajuste da curva de concentração por um polinômio de grau 2 (Figura 4.4), o qual foi derivado a fim de obter as velocidades da reação (Tabela 4.3).

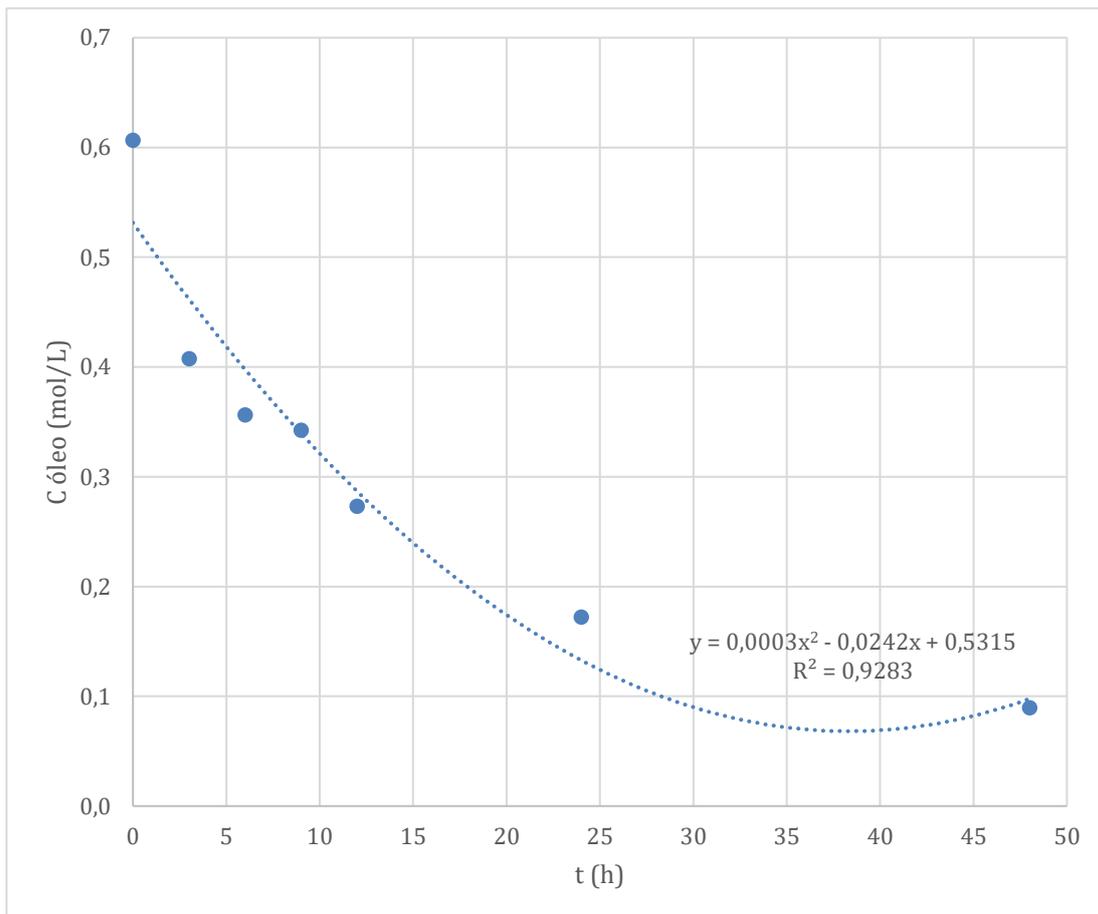


Figura 4.4 – Ajuste polinomial de segunda ordem do perfil de concentração.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.3 – Velocidades de reação calculadas pela derivação do polinômio.

[Óleo] (mol/L)	V (mol/L/h)
0,607	0,0242
0,408	0,0224
0,356	0,0206
0,343	0,0188
0,273	0,0170
0,172	0,0098
0,090	-0,0046

Fonte: Arquivo pessoal.

Realizou-se, então, o ajuste para o modelo de Michaelis-Menten através da linearização de Lineweaver-Burk, demonstrada pela Equação 4.1.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{V_{m\acute{a}x}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} \quad (\text{Equa\c{c}\~ao 4.1})$$

O grafico da equaao linearizada est demonstrado na Figura 4.5, assim como um ajuste de regressao linear para obter os coeficientes angular e linear. O ponto inicial foi descartado em vista da alta imprecisao na obtenao da velocidade no tempo zero de reaao.

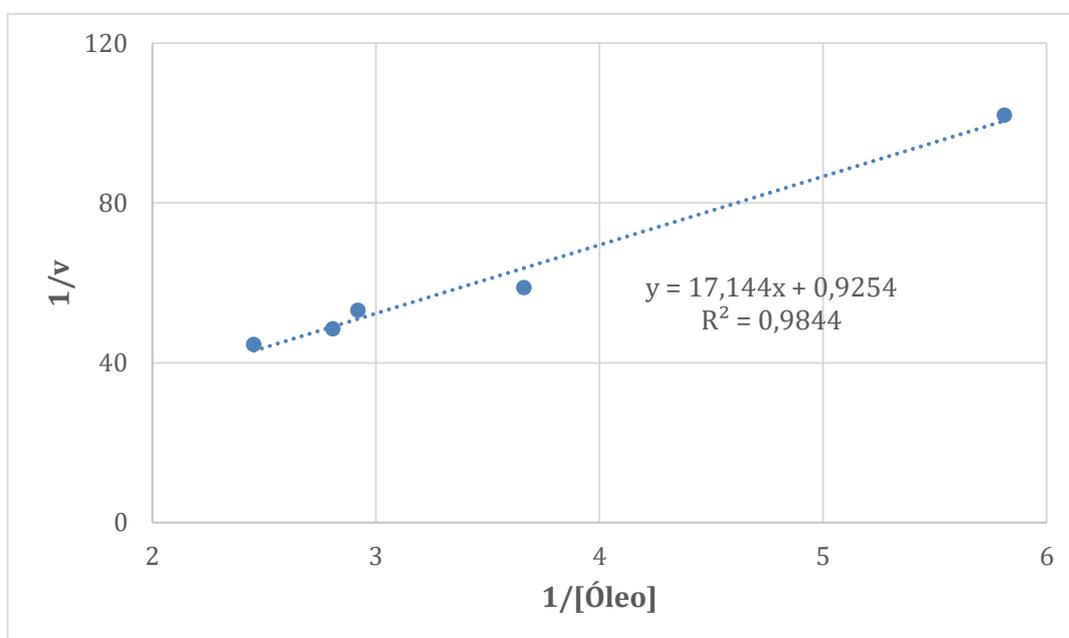


Figura 4.5 – Grafico de linearizaao da equaao de Michaelis-Menten.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos valores dos coeficientes angular e linear, foi possível calcular os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, como apresentado na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 – Parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten.

K_M (mol/L)	$V_{m\acute{a}x}$ (mol/L/h)
18,53	1,08

Fonte: Arquivo pessoal.

Para verificação da eficácia do ajuste, foi construída uma curva comparativa entre os dados experimentais e os calculados através da equação de Michaelis-Menten (Figura 4.6).

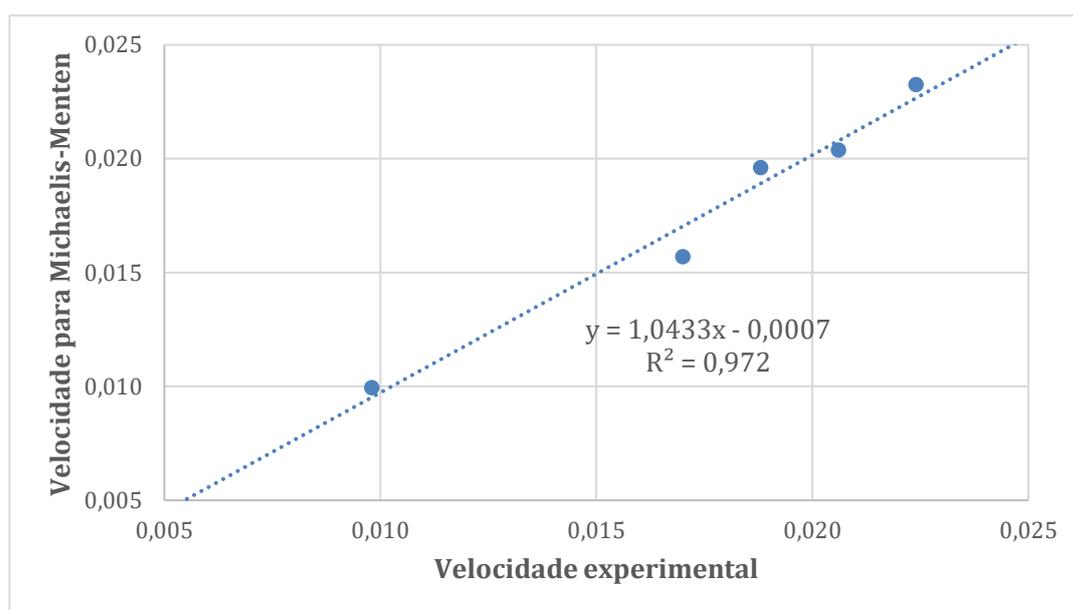


Figura 4.6 – Curva de semelhança entre a velocidade ajustada e experimental.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos valores dos coeficientes da regressão linear da curva comparativa, percebe-se que o ajuste ao modelo de Michaelis-Menten foi eficiente, uma vez que o coeficiente angular possui valor aproximado de 1 e o coeficiente linear valor aproximado de 0, assim demonstrando a semelhança entre os parâmetros experimentais e ajustados.

De acordo com o que foi mostrado por Paiva et al. (2000), quando há excesso de um dos reagentes as equações das taxas do modelo Ping Pong Bi Bi podem ser expressas na forma do modelo de Michaelis-Menten. Para esse estudo, comprova-se essa tendência, uma vez que a reação foi bem descrita pelo modelo de Michaelis-Menten, apesar de haver estudos na literatura que mostram uma melhor adequação da transesterificação ao Ping Pong Bi Bi.

4.1.3. Terceiro estudo de caso

No terceiro estudo, tomou-se como base os resultados reportados na Tese do Dr. Rafael de Araujo Silva (Araujo-Silva, 2022), acerca da síntese de biolubrificantes a partir do DDOS (destilado da desodorização do óleo de soja) e álcool isoamílico. Nesse trabalho, o autor estudou a catálise enzimática utilizando a lipase Eversa Transform® na forma livre.

Inicialmente, foi utilizada a metodologia apresentada no tópico 3.6 para transformar os dados de rendimento de ésteres em dados de concentração molar dos reagentes ao longo do tempo. Em seguida, a partir dos dados extraídos, iniciou-se um estudo cinético da reação, levando em consideração os modelos cinéticos apresentados no Tópico 2.4.

Realizando as mesmas considerações do estudo de caso anterior, foi possível obter o perfil de consumo dos reagentes ao longo do processo (Figura 4.7). As condições de reação estão apresentadas na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 – Condições de processo estabelecidas por Araujo-Silva, 2022.

Propriedades	Condição
Razão molar DDOS/Álcool	1:2,5
Temperatura (°C)	45
Carga enzimática (g enzima/g DDOS)	6%
Concentração de peneira molecular (% wt.)	9

Fonte: Adaptado de Araujo-Silva, 2022.

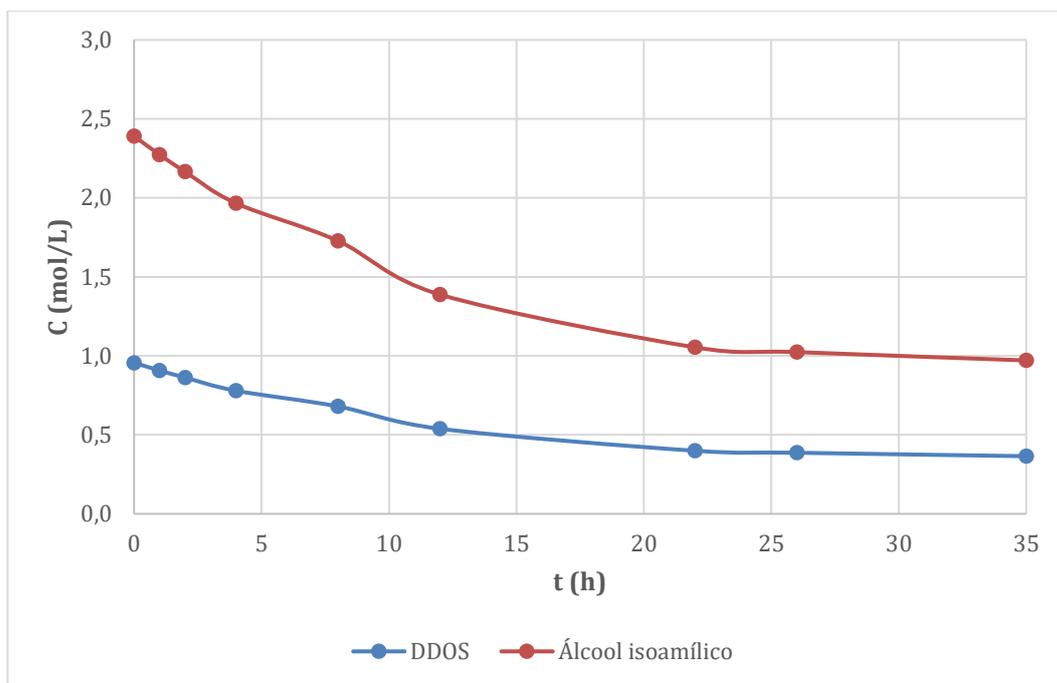


Figura 4.7 – Perfil de consumo dos reagentes ao longo da reação de transesterificação do DDOS.

Fonte: Arquivo pessoal.

A seguir, para determinar a velocidade de reação, realizou-se o ajuste da curva de concentração a um polinômio de segundo grau, e em seguida derivou-se essa equação a fim de obter o perfil de velocidades.

Tabela 4.6 – Velocidades de reação calculadas.

T (h)	[DDOS] (mol/L)	v (mol/L/h)
0	0,956	0,040
1	0,907	0,038
2	0,863	0,037
4	0,779	0,034
8	0,680	0,029
12	0,539	0,023
22	0,399	0,009
26	0,387	0,003
35	0,365	-0,009

Fonte: Arquivo pessoal.

Na Figura 4.8 é possível perceber que a curva forma o contorno de uma hipérbole, sendo bem compatível com a curva do modelo de Michaelis-Menten, apresentada na Figura 2.11. Assim, foi realizada a linearização de Lineweaver-Burk com os dados de velocidade obtidos (Figura 4.9).

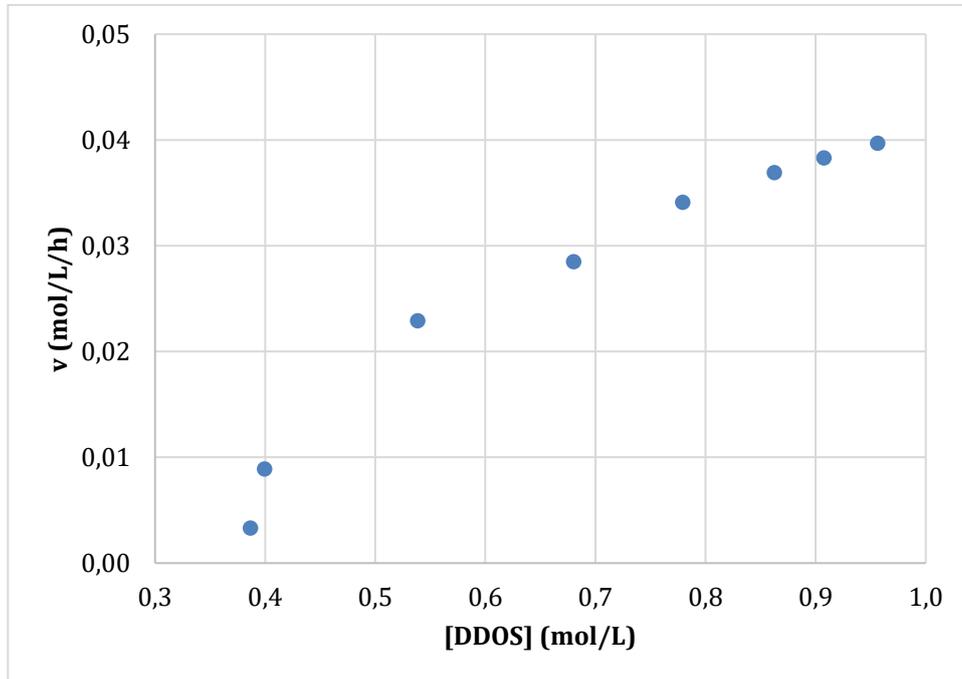


Figura 4.8 – Perfil de velocidade pela concentração do substrato.

Fonte: Arquivo pessoal.

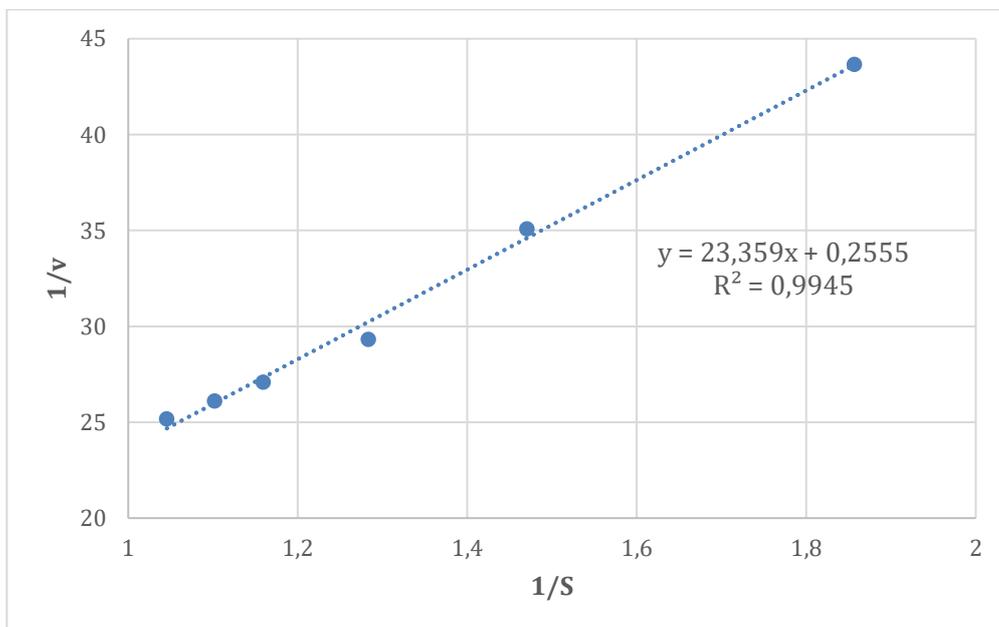


Figura 4.9 – Linearização de Lineweaver-Burk para os dados experimentais.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir dos valores dos coeficientes angular e linear, foi possível calcular os parâmetros cinéticos de Michaelis-Menten, como apresentado na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Parâmetros cinéticos para o modelo de Michaelis-Menten.

K_M (mol/L)	$V_{máx}$ (mol/L/h)
91,42	3,91

Fonte: Arquivo pessoal.

Para verificação da eficácia do ajuste, foi construída uma curva comparativa entre os dados experimentais e os calculados através da equação de Michaelis-Menten.

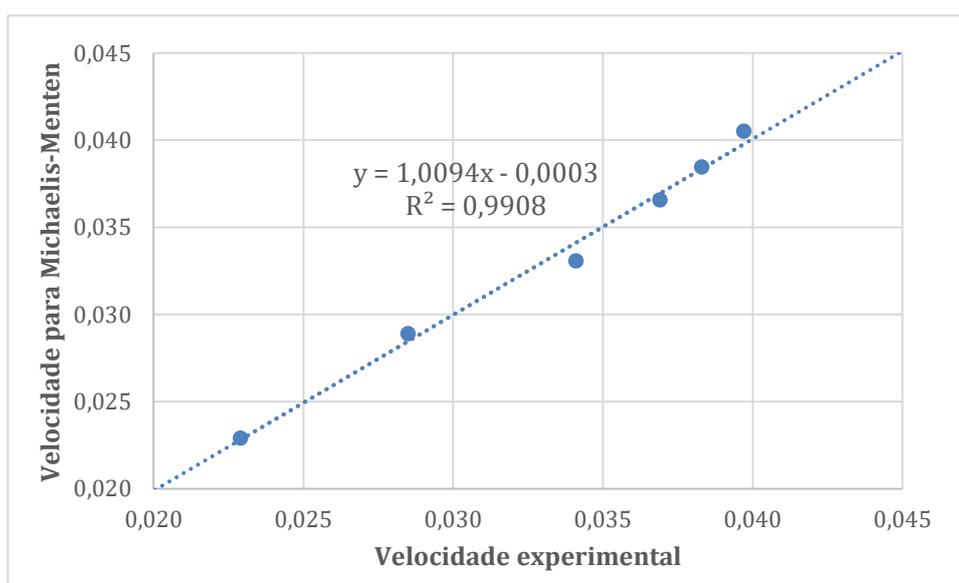


Figura 4.10 – Curva de semelhança entre a velocidade ajustada e experimental.

Fonte: Arquivo pessoal.

Novamente, utilizando a curva de semelhança (Figura 4.10), percebe-se que o ajuste ao modelo de Michaelis-Menten foi eficiente, uma vez que o coeficiente angular possui valor aproximado de 1 e o coeficiente linear valor aproximado de 0, assim demonstrando que os parâmetros experimentais e ajustados são aproximadamente iguais.

Com relação às constantes do modelo obtidas, elas apresentaram valores em uma faixa similar aos ajustes anteriores, permitindo observar a tendência das lipases de possuírem as constantes K_M mais elevada quando comparadas com outras enzimas, uma vez que Marangoni (2003) reportou que a constante K_M para a maioria das enzimas se mantém na faixa de 10^{-1} e 10^{-7} .

4.2. Determinação da concentração de proteína

A determinação da concentração de proteínas presentes na enzima utilizada ao longo da pesquisa (Eversa Transform, formulação líquida de lipase de *Thermomyces lanuginosus*) foi realizada através do Método de Bradford. Desse modo, foram preparadas amostras (em duplicata) de 0,025 mL com diferentes concentrações de uma proteína padrão (albumina de soro bovino), juntamente com 1 mL de reagente de Bradford (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), incubando-se por 10 min e depois analisando a absorbância em espectrofotômetro UV-VIS em comprimento de onda de 595 nm. A curva padrão (Figura 4.11) obtida mostra a relação entre absorbância e concentração de proteína na amostra.

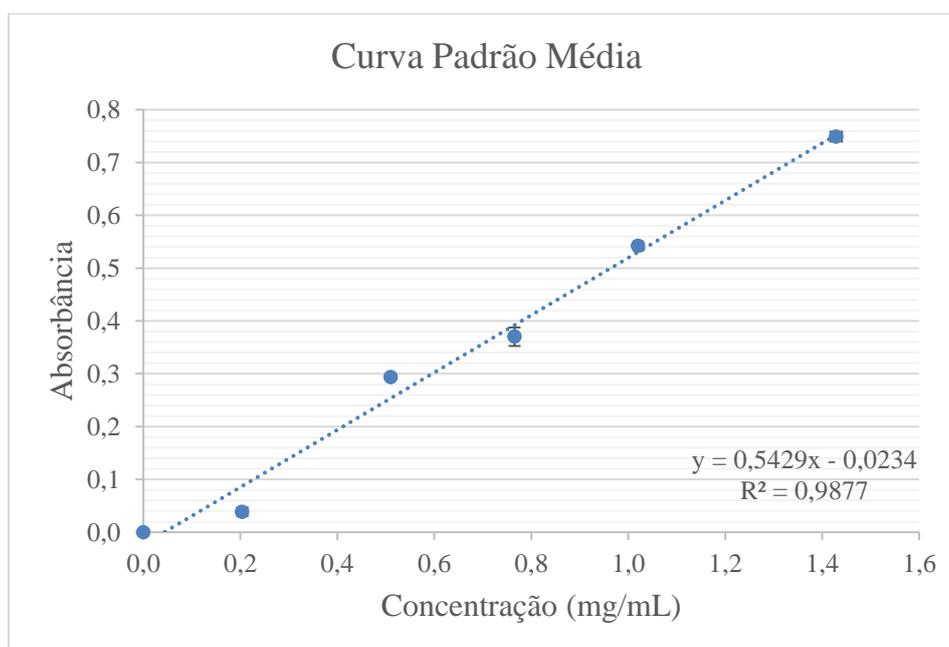


Figura 4.11 – Curva padrão para dosagem de proteínas pelo método de Bradford.

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir de amostras de soluções de lipase em diferentes diluições, a concentração de proteínas na formulação líquida comercial de Eversa foi determinada a partir da curva de calibração construída, obtendo-se uma concentração de $38,21 \pm 0,88$ mg de proteínas/mL de enzima líquida.

4.3. Ensaios de especificidade da enzima

Dando continuidade às etapas experimentais, determinou-se a especificidade da lipase com relação a diferentes ácidos graxos comerciais, de modo a avaliar sua afinidade com relação ao tamanho da cadeia carbônica e presença de insaturações.

Foram realizadas reações de síntese (esterificação) de ésteres de ácidos graxos a partir de ácidos graxos comerciais como doadores acila e álcool isoamílico como receptor de grupos acila em proporção molar de 1:1 e com carga enzimática de 5% (massa enzima/massa ácido graxo). A temperatura foi fixada em 40 °C, com agitação de 250 rpm em Shaker, e a conversão dos ácidos foi avaliada após 24 h de reação.

Para essa etapa, a determinação da concentração dos ácidos na amostra foi, inicialmente, realizada por titulação ácido-base, tendo como indicador a fenolftaleína.

A primeira bateria de experimentos foi realizada em triplicata para uma concentração fixa de ácido de 0,1 M, em que se diluiu a amostra com heptano, obtendo-se os resultados de conversão ($X_{\text{ácido}}$) apresentados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano analisada por titulação ácido-base.

Ácidos	Cadeia Carbônica	$X_{\text{ácido}} \pm \text{s.d.} (\%)$
Ácido Butírico	C4:0	7,21 \pm 1,85
Ácido Láurico	C12:0	57,84 \pm 4,84
Ácido Palmítico	C16:0	47,43 \pm 10,45
Ácido Esteárico	C18:0	23,97 \pm 15,62
Ácido Oleico	C18:1	21,19 \pm 7,25
Ácido Linoleico	C18:2	25,03 \pm 1,04

Fonte: Arquivo pessoal.

Também foi adotado um outro sistema de solventes composto por uma mistura de um solvente apolar e outro polar (heptano/DMSO na razão 3/2, v/v). As reações de esterificação de ácidos graxos neste sistema de solventes foram realizadas em triplicata e renderam as conversões ($X_{\text{ácido}}$) apresentadas na Tabela 4.9.

Tabela 4.9 – Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano e DMSO analisada por titulação ácido-base.

Ácidos	Cadeia Carbônica	$X_{\text{ácido}} \pm \text{s.d.} (\%)$
Ácido Butírico	C4:0	$7,36 \pm 1,22$
Ácido Láurico	C12:0	$7,81 \pm 0,46$
Ácido Palmítico	C16:0	$3,48 \pm 2,40$
Ácido Estearico	C18:0	$9,90 \pm 6,18$
Ácido Oleico	C18:1	$9,71 \pm 2,10$
Ácido Linoleico	C18:2	$4,81 \pm 2,02$

Fonte: Arquivo pessoal.

A partir desse método de análise (por titulação), os resultados dos ensaios (Tabelas 4.8 e 4.9) apresentaram desvios padrões muito elevados para a maioria dos ácidos avaliados. Essas divergências podem ser resultado da dificuldade de identificar o ponto de viragem da solução através de um indicador visual, ou também pelo fato de alguns ácidos formarem uma emulsão durante a titulação que também dificulta essa visualização.

Assim, investigou-se a determinação das conversões pelo consumo de ácidos graxos quantificados por cromatografia gasosa (GC). Para isso, um novo conjunto de experimentos (em triplicada) foi realizado que renderam as conversões ($X_{\text{ácido}}$) apresentadas nas Tabelas 4.10 e 4.11. Nestes experimentos, os desvios padrões foram baixos (menor que 10% do valor principal), mostrando a boa reprodutibilidade dos resultados.

Nas condições de operação do cromatógrafo a gás, não foi possível identificar ácido butírico por ser um ácido leve.

Tabela 4.10 – Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano analisada por GC.

Ácidos	Cadeia Carbônica	$X_{\text{ácido}} \pm \text{s.d.} (\%)$
Ácido Láurico	C12:0	$25,54 \pm 2,25$
Ácido Palmítico	C16:0	$44,59 \pm 1,47$
Ácido Estearico	C18:0	$81,44 \pm 2,42$
Ácido Oleico	C18:1	$36,23 \pm 1,93$

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.11 – Conversão dos ácidos graxos com diluição em heptano e DMSO analisada por GC.

Ácidos	Cadeia Carbônica	X _{ácido} ± s.d. (%)
Ácido Láurico	C12:0	41,07 ± 2,26
Ácido Palmítico	C16:0	41,19 ± 0,52
Ácido Esteárico	C18:0	19,71 ± 0,44
Ácido Oleico	C18:1	4,58 ± 0,46

Fonte: Arquivo pessoal.

A Tabela 4.10 mostra uma tendência clara pela maior afinidade da enzima por ácidos graxos saturados de cadeia longa, em que a conversão da reação foi, praticamente, dobrando com o aumento da cadeia carbônica do ácido. E, para cadeias com o mesmo número de átomos de carbono (C18:0 e C18:1), a enzima foi menos específica para ácido graxo insaturado.

A Tabela 4.11 mostra que a adição de DMSO no solvente alterou significativamente a afinidade da enzima, favorecendo a reação com ácidos graxos de cadeias médias (láurico e palmítico).

Independentemente do solvente utilizado (heptano ou heptano/DMSO), as maiores afinidades da enzima foram nitidamente para ácidos graxos saturados do que insaturados, no caso ácido oleico. Assim, óleo de coco, rico em ácidos graxos saturados, foi escolhido para ser avaliado na reação de transesterificação com álcool isoamílico.

4.4. Ensaios de longa duração

A etapa experimental seguinte analisou a conversão ou rendimento através de ensaios de longa duração. Tomou-se como base os resultados preliminares obtidos na análise de titulação para escolha dos reagentes, por uma questão de cronograma, sendo eles o ácido láurico (obteve maior conversão pela Tabela 4.8) e óleo de coco (rico em ácido láurico), assim como para a escolha do heptano como solvente.

Utilizando as mesmas condições fixadas anteriormente (razão molar de 1:1, carga enzimática de 5%, 40 °C, agitação de 250 rpm) e com peneira molecular (agente dessecante) foi realizado a reação de esterificação de ácido láurico com álcool isoamílico. Para essas reações, avaliou-se o consumo desse ácido em diversos períodos de tempo (até conversão

constante) para construção de um perfil de conversão em longa duração, exibido na Figura 4.12, apresentando os resultados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Perfil de concentração e conversão do ácido láurico ao longo da reação de esterificação com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:1 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e presença de peneira molecular.

t (h)	C (g/L)	X (%)
0	1,763 ± 0,095	0,0%
1	1,642 ± 0,007	6,9%
3	1,601 ± 0,021	9,2%
6	1,595 ± 0,022	9,6%
12	1,532 ± 0,015	13,1%
24	0,968 ± 0,023	45,1%

Fonte: Arquivo pessoal.

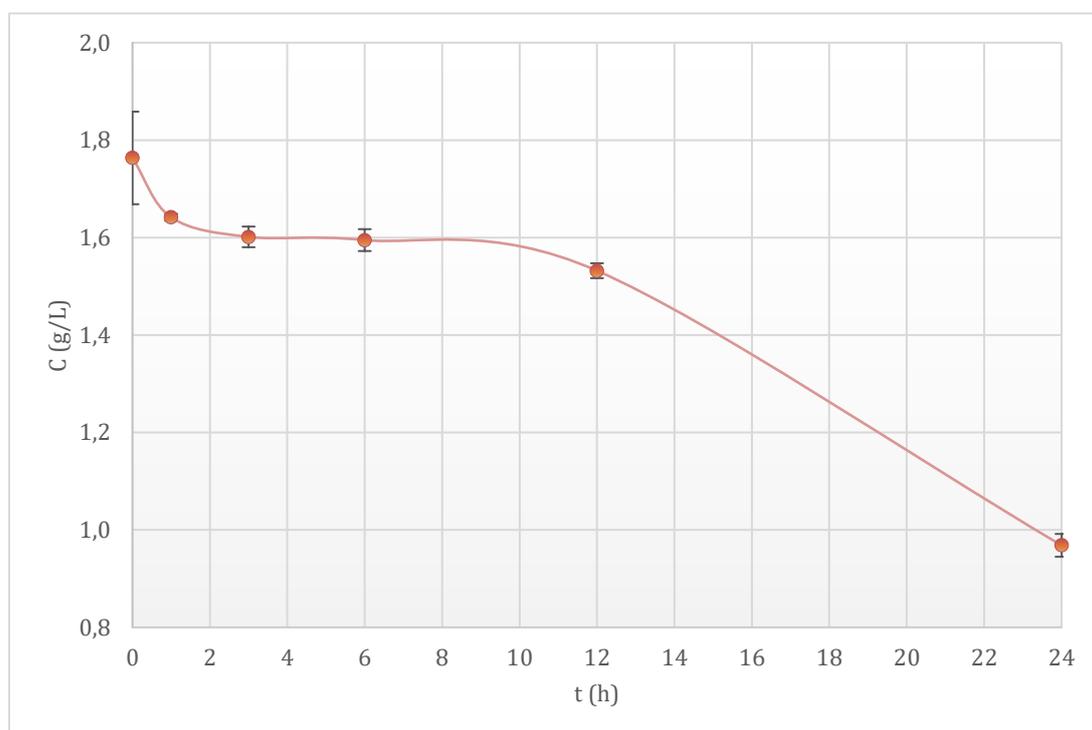


Figura 4.12 – Perfil de concentração do ácido láurico ao longo da reação de esterificação com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:1 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e presença de peneira molecular.

Fonte: Arquivo pessoal.

Primeiramente, é possível notar que a conversão de ácido láurico após 24 h de reação foi de 45%, valor em torno de 20% acima do obtido no ensaio de especificidade da enzima.

Esse aumento foi devido à ação da peneira molecular que foi utilizada nessa etapa, uma vez que ela remove a água do meio reacional, favorecendo o equilíbrio da reação para formação dos produtos. Pode-se determinar, portanto, que a água apresentou forte impacto na ocorrência da reação.

A partir dos resultados obtidos, foi possível aplicar o método de determinação dos parâmetros cinéticos, atingindo-se melhores resultados para o modelo de Ping Pong Bi Bi (Equação 2.2). Os resultados dos parâmetros podem ser observados na Tabela 4.13 e na Figura 4.13.

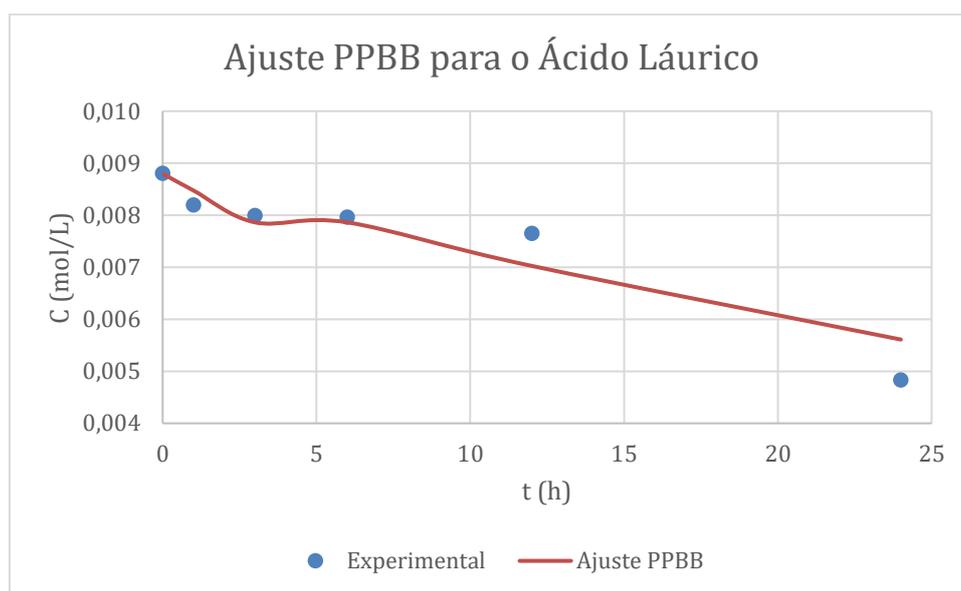


Figura 4.13 – Ajuste do modelo cinético Ping Pong Bi Bi para a reação de esterificação de ácido láurico com álcool isoamílico (40°C, razão molar 1:1 e 250 rpm de agitação, Eversa Transform (5%) líquida e presença de peneira molecular).

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.13 – Parâmetros cinéticos da reação do ácido láurico.

$V_{\text{máx}}$ (mol/L/min)	1,87
Km_A (mol/L)	24,89
Km_B (mol/L)	24,89

Fonte: Arquivo pessoal.

É possível observar que o ajuste destoa bastante dos pontos experimentais após as 12 h, entretanto adequa-se bem ao início da reação. Comparando os resultados obtidos para os parâmetros cinéticos com os obtidos na seção 4.1.1 pode-se notar que o $v_{\text{máx}}$ encontra-se dentro

do intervalo obtido anteriormente, entretanto, há grande variação para os valores de K_M , o que pode ser atribuído ao uso de reagentes diferentes.

Em seguida foi realizado, também, o perfil de conversão de uma reação de transesterificação usando óleo de coco e álcool isoamílico (solubilizado em heptano), em razão molar óleo/álcool 1:6, acompanhando a formação de ésteres ao longo da reação. O perfil está apresentado na Figura 4.14, a partir dos dados apresentados na Tabela 4.14.

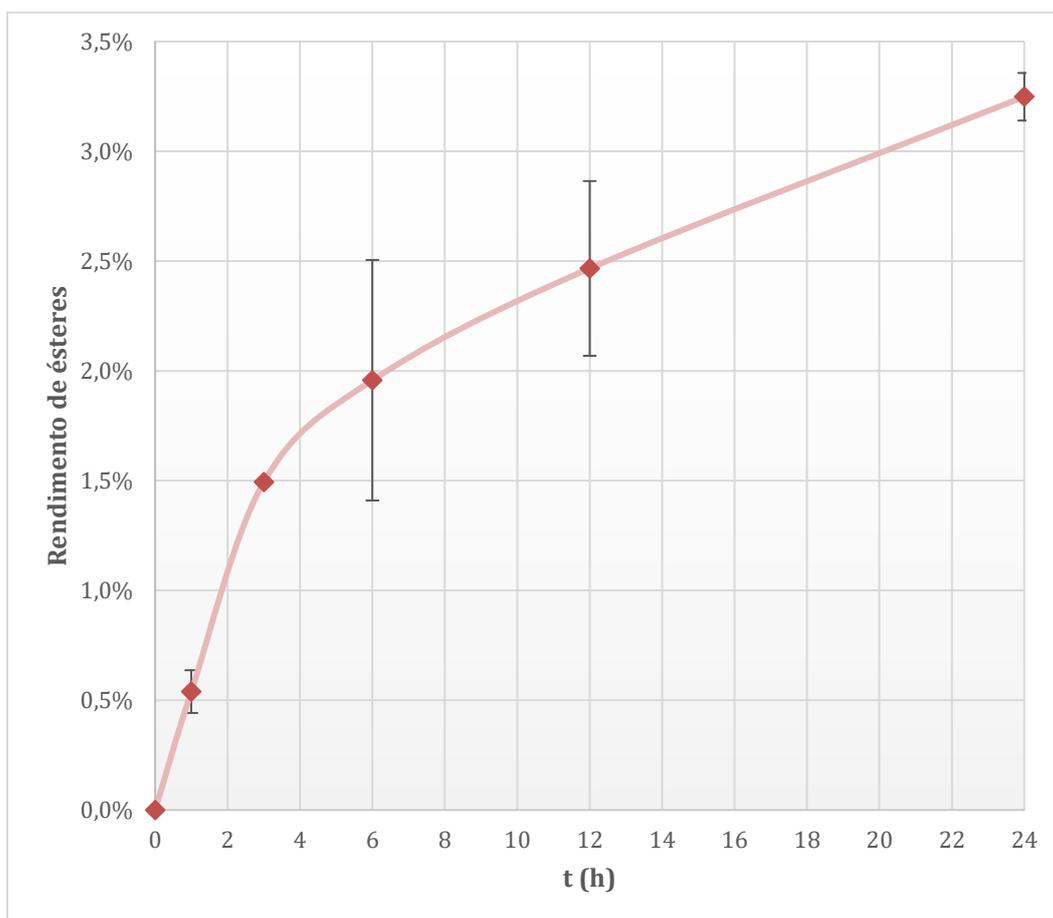


Figura 4.14 – Perfil de rendimento dos ésteres isoamílicos ao longo da reação de transesterificação de óleo de coco com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:6 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e sem presença de peneira molecular.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4.14 – Perfil de rendimento e concentração dos ésteres isoamílicos ao longo da reação de transesterificação de óleo de coco com álcool isoamílico a 40°C, razão molar 1:6 e 250 rpm de agitação catalisada por Eversa Transform (5%) líquida e sem presença de peneira molecular.

t (h)	C (g/L)	Rendimento (%)
0	0,000	0,00 ± 0,08
1	0,122	0,54 ± 0,10
3	0,339	1,49 ± 0,01
6	0,445	1,96 ± 0,55
12	0,560	2,47 ± 0,40
24	0,738	3,25 ± 0,11

Fonte: Arquivo pessoal.

Nota-se que o rendimento de ésteres foi baixo (menor que 3,5% após 24 h de reação), provavelmente em razão da afinidade da enzima discutida anteriormente. Observando o percentual dos ácidos graxos no óleo de coco, tem-se que o de maior concentração é o ácido láurico, sendo que o ácido esteárico possui teor de cerca de 9% (ácido pelo qual a enzima mostrou maior afinidade).

Considerando a análise de especificidade analisada por cromatografia gasosa, o ácido esteárico possuiu a maior conversão de todos, sendo cerca de 4 vezes maior que a conversão do ácido láurico, assim, pode-se atribuir o baixo rendimento em ésteres pela menor afinidade da enzima com o tamanho de cadeia mais presente no óleo (C12).

5. CONCLUSÃO

Em meio ao cenário de pandemia da Covid-19 em que a parte experimental do trabalho foi desenvolvida, não foi possível estudar as influências de diferentes matérias-primas a fundo, portanto, uma complementação do trabalho atual seria interessante, de modo a realizar outros ensaios de longa duração com óleos e gorduras diferentes, além de utilizar resíduos ricos em ácidos graxos, como a borra e o destilado da desodorização gerados no refino de óleos vegetais.

Também, seria importante determinar as condições ótimas para a reação e avaliar os biolubrificantes obtidos quanto suas propriedades físico-químicas, reológicas e tribológicas.

Apesar dos impedimentos, os resultados obtidos foram bem significativos. A determinação da especificidade da enzima, especialmente utilizando heptano como solvente, demonstrou um padrão interessante de aumento de conversão com o aumento do tamanho de cadeia para os ácidos saturados.

Pelo perfil de longa duração do ácido láurico, ficou perceptível a grande influência que a água do meio possui na reação, uma vez que a conversão ao final de 24 h foi praticamente 2 vezes maior quando se utilizou peneira molecular no meio reacional.

Também, determinou-se que o óleo de coco não possui bons rendimentos de ésteres isoamílicos quando solubilizado em heptano, o que se atribuiu ao grande teor de ácido láurico presente no óleo, o qual possui baixa afinidade com a enzima.

Com relação aos ajustes cinéticos, foi possível comprovar a tendência de ajuste ao modelo de Michaelis-Menten quando há excesso de um dos reagentes na reação de transesterificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIEIRAS, Erika C. G.; LANGONE, Susana L. Souza e Marta A. P.. Estudo Do Comportamento Da Lipase Comercial Lipozyme Rm Im Em Reações De Esterificação Para Obtenção De Biodiesel. **Química Nova**, Rio de Janeiro, v. 36, p. 646-650, fev. 2013.

AHMAD, Uzair *et al.* A review on properties, challenges and commercial aspects of eco-friendly biolubricants productions. **Chemosphere**, [S.L.], v. 309, p. 136622, dez. 2022. Elsevier BV.

ALVES, L. M. **Cinética Enzimática** (UNESP, Ed.), 2016. Disponível em: <https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/tecnologia/luciamariacararetoalves/aula-7-cinetica-enzimatica.pdf>. Acesso em: 3 maio. 2022

ANP. **Painel Dinâmico do Mercado Brasileiro de Lubrificantes**. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/anp/pt-br/centrais-de-conteudo/paineis-dinamicos-da-anp/paineis-dinamicos-do-abastecimento/painel-dinamico-do-mercado-brasileiro-de-lubrificantes>. Acesso em: 28 nov. 2023.

ARAÚJO, Anderson Magalhães *et al.* BORRA ÁCIDA DO PROCESSAMENTO DO ÓLEO DE SOJA: processos reacionais e caracterizações. **Anais do XIV Encontro Nacional de Estudantes de Engenharia Ambiental**, out. 2016. Editora Edgard Blücher.

ARAÚJO, Anderson Magalhães. **BORRA DE ÓLEO DE SOJA: CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA POTENCIALIDADE ECONÔMICA**. 2016. 83 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2016.

ARAUJO-SILVA, Rafael de *et al.* Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Isoamyl Monoesters from Soybean Oil Deodorizer Distillate: a renewable and ecofriendly base stock for lubricant industries. **Molecules**, [S.L.], v. 27, n. 9, p. 2692, 22 abr. 2022. MDPI AG.

ARAUJO-SILVA, Rafael de. **Synthesis Of Isoamyl Esters From Soybean Oil Deodorizer Distillate By Enzymatic Catalysis For Biolubricant Applications**. 2022. 143 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2022.

ASQUI, Maritza Paola Maisincho; DEMERA, María Hipatia Delgado; PALACIOS, Carlos Alfredo Cedeno. Modelos Matemáticos En La Cinética Enzimática. *Una Revisión*, Santa Clara, v. 49, n. 1, p. 115-131, março 2022.

BARBERA, Elena *et al.* Recent developments in synthesizing biolubricants — a review. **Biomass Conversion And Biorefinery**, [S.L.], 10 fev. 2022. Springer Science and Business Media LLC.

BART, Jan C.J.; GUCCIARDI, Emanuele; CAVALLARO, Stefano. **Biolubricants: Science and Technology**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013.

BATISTA, J. B.. Cinética enzimática. Universidade de São Paulo. 2015. Disponível em: <http://www.debiq.eel.usp.br/~joabatista/aula2cineticaenzimatica.pdf>. Acesso em: 22 dez. 2023.

BOLINA, Iara C. A.; GOMES, Raphael A. B.; MENDES, Adriano A.. Biolubricant Production from Several Oleaginous Feedstocks Using Lipases as Catalysts: current scenario and future perspectives. **Bioenergy Research**, [S.L.], v. 14, n. 4, p. 1039-1057, 5 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC.

BORGES, J. C. Cinética Enzimática. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/3274595/mod_resource/content/1/Aula10BioqI_CinEnzimática.pdf. Acesso em: 15 dez. 2023.

BRADFORD, Marion M.. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, maio 1976.

BRÊDA, Gabriela Coelho *et al.* Current approaches to use oil crops by-products for biodiesel and biolubricant production: focus on biocatalysis. **Bioresource Technology Reports**, [S.L.], v. 18, p. 101030, jun. 2022. Elsevier BV.

CARRIJO, Tayná de Souza. **REFINO DE ÓLEOS VEGETAIS**. 2019. BetaEQ. Disponível em: <https://betaeq.com.br/index.php/2019/06/06/refino-de-oleos-vegetais/>. Acesso em: 13 set. 2020.

CASTRO, Heizir F. de. **Processos Químicos Industriais II: Óleos e Gorduras**. Apostila 5. Lorena: Escola de Engenharia de Lorena – EEL, 2014. 22 p.

CECILIA, Juan Antonio *et al.* An Overview of the Biolubricant Production Process: challenges and future perspectives. **Processes**, [S.L.], v. 8, n. 3, p. 257, 25 fev. 2020. MDPI AG.

CHAPMAN, Jordan; ISMAIL, Ahmed E.; DINU, Cerasela Z. Industrial applications of enzymes: Recent advances, techniques, and outlooks. **Catalysts**, v. 8, artigo 238, 2018.

CHOI, Jung-Min; HAN, Sang-Soo; KIM, Hak-Sung. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1443-1454, 2015.

DICOSIMO, Robert *et al.* Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Review**, v. 42, p. 6437-6474, 2013.

FERNANDES, Keysson Vieira *et al.* Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of *Candida rugosa* lipase. **Catalysis Today**, v. 362, p. 122-129, fev. 2021.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, p. 197–212, 2010.

FERRARI, R. Ap. *et al.* Minor constituents of vegetable oils during industrial processing. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 5, p. 587-592, 1996.

FOGLER, H. Scott. **Elementos de Engenharia das Reações Químicas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2014.

GANESAN, Devanesan; RAJENDRAN, Aravindan; THANGAVELU, Viruthagiri. An overview on the recent advances in the transesterification of vegetable oils for biodiesel production using chemical and biocatalysts. **Reviews In Environmental Science and Bio/technology**, v. 8, n. 4, p. 367-394, 23 out. 2009.

GARCÍA-ZAPATEIRO, Luis A. *et al.* Viscosity modification of high-oleic sunflower and castor oils with acid oils-derived estolides for lubricant applications. **European Journal of Lipid Science and Technology**, ago. 2013.

GRAND VIEW RESEARCH. **Lubricants Market Size, Share & Trends Analysis Report By Application, By Region, And Segment Forecasts, 2021 - 2028**. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lubricants-market>. Acesso em: 20 out. 2022.

GUIMARÃES, Jairo. **Refino de Óleos Lubrificantes de Motores de Combustão Interna Pelo Processo de Ultrafiltração e Adsorção**. 2006. 95 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

GUIMARÃES, José R. et al. Immobilization of Eversa® Transform via CLEA technology converts it in a suitable biocatalyst for biolubricant production using waste cooking oil. **Molecules**, v. 26, artigo 193, 2021.

HAIGH, K.F. *et al.* Kinetics of the pre-treatment of Used Cooking Oil Using Novozyme 435 for Biodiesel Production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 4, p. 713–719, abr. 2014.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. Modeling the Kinetics of Biolubricant Production from Castor Oil Using Novozym 435 in a fluidized-bed Reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 59, p. 252–259, ago. 2014.

HELWANI, Z. *et al.* Solid heterogeneous catalysts for transesterification of triglycerides with methanol: a review. **Applied Catalysis A: General**, [S.L.], v. 363, n. 1-2, p. 1-10, jul. 2009.

HO, Calvin K.; MCAULEY, Kimberley B.; PEPPLEY, Brant A.. Biolubricants through renewable hydrocarbons: a perspective for new opportunities. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 113, p. 109261, out. 2019. Elsevier BV.

ISLAM, Hasibul. *et al.* Chicken tallow, a low-cost feedstock for the two-step lipase-catalysed synthesis of biolubricant. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 39, n. 1, p. 1-14, fev. 2023.

KEERA, S.T.; SABAGH, S.M. El; TAMAN, A.R.. Transesterification of vegetable oil to biodiesel fuel using alkaline catalyst. **Fuel**, v. 90, n. 1, p. 42-47, jan. 2011.

KLEINAITÉ, E. et al. A Cleaner Approach for Biolubricant Production Using Biodiesel as a Starting Material. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, n. 2, p. 40–44, jul. 2014.

LEUNG, Dennis Y.C.; WU, Xuan; LEUNG, M.K.H.. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy**, [S.L.], v. 87, n. 4, p. 1083-1095, abr. 2010.

MAGALHÃES, Shayane Pereira de. **ESTUDO DE MODELOS CINÉTICOS PARA A REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS**. 134 f. Dissertação (Mestrado) - Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

MARANGONI, A. G., **Enzyme Kinetics - A Modern Approach**. 1. ed. New Jersey: John Wiley and Sons Inc., p. 48-90, 2003.

MARQUARDT, D.W. **An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters**. *J.Soc.Indust.Appl.Math.*,11(2), p.431-441, jun. 1963.

MARTINS, André Rosa. Representação do efeito de inibição enzimática reversível para o modelo cinético de Michaelis-Menten no estado transiente. **Brazilian Journal Of Food Technology**, [S.L.], v. 18, n. 2, p. 112-120, jun. 2015.

MATOS, Paulo Roberto Rodrigues de. **Utilização de Óleos Vegetais como Bases Lubrificantes**. 2011. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

MAY, Decio Tily. **OTIMIZAÇÃO ENERGÉTICA APLICADA AO PROCESSO DE REFINO DE ÓLEOS VEGETAIS**. 1998. 95 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.

MEHER, L; VIDYASAGAR, D; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 248-268, jun. 2006.

Microbiology Note. Inibição Enzimática – Definição, Tipos, Mecanismo, Exemplos. 25 out. 2023. Disponível em: <https://microbiologynote.com/pt/exemplos-de-mecanismos-de-definição-de-tipos-de-inibição-enzimática/>. Acesso em: 22 dez. 2023.

MIRANDA, Letícia P. et al. Composites of crosslinked aggregates of Eversa® Transform and magnetic nanoparticles. Performance in the ethanolysis of soybean oil. **Catalysts**, v. 10, artigo 817, 2020.

MOBARAK, H.M. *et al.* The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, [S.L.], v. 33, p. 34-43, maio 2014. Elsevier BV.

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

OLIVEIRA, Admar Costa de *et al.* O uso do destilado da desodorização do óleo de soja como fonte alternativa de vitamina E reduziu a evolução ponderal em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 18, n. 5, p. 693-697, out. 2005.

OLIVEIRA, Sara de Andrade Taipina de. **Estudo das unidades de desgomagem e neutralização**. 2012. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa, 2012.

PACHECO, Thályta; MENDES, Thais. **Guia Prático para Caracterização de Enzimas**. Embrapa Agroenergia, 2021.

PAIVA, A. L., BALCÃO, V. M., MALCATA, F. X., Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, 27, p. 187-204, 2000.

PAULI, Evandro Armini de; ULIANA, Fernando Saulo. **Lubrificação - Mecânica**. Apostila para o CPM - Programa de Certificação de Pessoal de Manutenção do Senai - Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial, 1997.

PERERA, Madhavi *et al.* Bioprocess development for biolubricant production using non-edible oils, agro-industrial byproducts and wastes. **Journal Of Cleaner Production**, [S.L.], v. 357, p. 131956, jul. 2022. Elsevier BV.

PINTO, Gerson Ferreira; MENEZES, Reginaldo Ramos de. **Cinética enzimática**. Rio de Janeiro: E-Papers Serviços Editoriais, 2009.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z.. The Chemistry of Oils and Fats and their Extraction and Refining Processes. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2013. Disponível em: <http://rvq-sub.sbgq.org.br/index.php/rvq/article/view/360>. Acesso em: 13 set. 2020.

SANTOS, Regiane Ribeiro dos. **Caracterização E Aplicação De Borrás Do Refino De Óleos Vegetais Para Produção De Lipase Fúngica Por Fermentação No Estado Sólido**. 97 f. Dissertação

(Mestrado) - Curso de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

KLINE. **MERCADO GLOBAL DE LUBRIFICANTES**. São Paulo: Factor-Kline, 2015. Color. Disponível em: <https://portallubes.com.br/wp-content/uploads/2016/06/2-Sergio-Rebelo-Kline.pdf>. Acesso em: 27 set. 2020.

SARMA, Rakesh Narayana; VINU, Ravikrishnan. Current Status and Future Prospects of Biolubricants: properties and applications. **Lubricants**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 70, 16 abr. 2022. MDPI AG.

SCHUCHARDT, Ulf; SERCHELI, Ricardo; VARGAS, Rogério Matheus. Transesterification of vegetable oils: a review. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, v. 9, n. 3, maio 1998.

SHELDON, Roger A. CLEAs, combi-CLEAs and ‘smart’ magnetic CLEAs: Biocatalysis in a bio-based economy. **Catalysts**, v. 9, artigo 261, 2019.

SILVA, Alberto Eduardo de Oliveira e. **Transposição Didática: A Química dos Óleos Lubrificantes**. 2011. 59 f. TCC (Graduação) - Curso de Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2011

SILVA, José André Cavalcanti da *et al.* Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 323-329, dez. 2015.

SILVA, José André Cavalcanti da. **Obtenção De Um Lubrificante Biodegradável A Partir De Ésteres Do Biodiesel Da Mamona Via Catálise Enzimática E Estudos De Estabilidade Oxidativa E Térmica**. 2012. 188 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

SILVA, José. **Diferenciação numérica. Mecânica computacional para mecatrônica**. 1. ed. São Paulo: USP, 2019. p. 18-22. Disponível em: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/7494351/mod_folder/content/0/a5-3401_2019.pdf. Acesso em: 31 jan. 2024.

SONI, Sunny; AGARWAL, Madhu. Lubricants from renewable energy sources – a review. **Green Chemistry Letters And Reviews**, v. 7, n. 4, p. 359-382, out. 2014.

SOUSA, Isamayra Germano de. *et al.* A novel hybrid biocatalyst from immobilized Eversa® Transform 2.0 lipase and its application in biolubricant synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 40, n. 1, p. 1-18, 11 nov. 2022.

SYAHIR, A.Z. *et al.* A review on bio-based lubricants and their applications. **Journal Of Cleaner Production**, v. 168, p. 997-1016, dez. 2017.

TIRITAN, Maria Gabriela. **Refino De Óleos Vegetais Via Extração Líquido-Líquido Em Escala Piloto Com Eliminação Das Etapas De Clarificação E Desodorização**. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina, 2020.

VERZIU, Marian *et al.* Transesterification of vegetable oils over CaO catalysts. **Catalysis Today**, v. 167, n. 1, p. 64-70, jun. 2011.

VIEIRA, Ana Carolina *et al.* Performance of Liquid Eversa on Fatty Acid Ethyl Esters Production by Simultaneous Esterification/Transesterification of Low-to-High Acidity Feedstocks. **Catalysts**, [S.L.], v. 11, n. 12, p. 1486, 3 dez. 2021. MDPI AG.

WANCURA, João H. C. et al. Lipases in liquid formulation for biodiesel production: Current status and challenges. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 67, p. 648-667, 2020.

ZAINAL, N.A. *et al.* A review on the chemistry, production, and technological potential of bio-based lubricants. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 80-102, fev. 2018.