UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

Jaqueline Greco Duarte



Produção e caracterização de um novo biolubrificante obtido por hidroesterificação enzimática a partir do óleo de mamona

RIO DE JANEIRO

2018

Jaqueline Greco Duarte

Produção e caracterização de um novo biolubrificante obtido por hidroesterificação

enzimática a partir do óleo de mamona

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pós-

graduação em Bioquímica como parte dos requisitos

necessários à obtenção do grau de Doutor em

Bioquímica.

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Denise Maria Guimarães Freire

Dr. José André Cavalcanti da Silva

RIO DE JANEIRO

2018

ii

CIP - Catalogação na Publicação

D812p

Duarte, Jaqueline Greco
Produção e caracterização de um novo
biolubrificante obtido por hidroesterificação
enzimática a partir do óleo de mamona / Jaqueline
Greco Duarte. -- Rio de Janeiro, 2018.
218 f.

Orientador: Denise Maria Guimarães Freire. Coorientador: José André Cavalcanti da Silva. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, 2018.

1. Biolubrificantes. 2. Óleo de mamona. 3. Estolídeos. 4. Lipases. 5. Ácido ricinoléico. I. Freire, Denise Maria Guimarães, orient. II. Silva, José André Cavalcanti da , coorient. III. Título.

Jaqueline Greco Duarte

Produção e caracterização de um novo biolubrificante obtido por hidroesterificação enzimática a partir do óleo de mamona

Tese submetida ao corpo docente do curso de Pósgraduação em Bioquímica como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Bioquímica.

Prof^a. Denise Maria Guimarães Freire, D. Sc. – IQ - UFRJ

José André Cavalcanti da Silva, D. Sc. – CENPES/PETROBRAS

Prof^a. Viridiana Santana Ferreira Leitão, D. Sc. – IQ - UFRJ

Prof. Rodrígo Volcan Almeida, D. Sc. – IQ - UFRJ

Prof^a. Melissa Limoèiro Estrada Gutarra, D. Sc. – EQ - UFRJ

RIO DE JANEIRO JULHO 2018

Aline Machado de Castro, D. Sc. – CENPES/PETROBRAS

Dedicatória

Dedico esta tese a minha vó Euphrasia Brandão Duarte (1920-2007) e aos meus pais José Mauricio Duarte e Maria Greco Duarte.

À minha vó que aprendeu a ler, escrever e a "fazer contas"- como ela mesma dizia - sozinha, estudando pelos cadernos do irmão mais novo, em um lugar no interior do RJ, no qual nem luz se tinha. Que sempre reforçou a importância dos estudos e vibrava a cada nova conquista dos seus netos. Obrigada pelo seu exemplo de vida, coragem, humildade e força de vontade.

Te amo para sempre!

Aos meus pais, por sempre terem me apoiado, me incentivado e acreditado na minha capacidade. Principalmente, por terem feito o impossível, mesmos nos momentos mais difíceis, para que eu e meu irmão pudéssemos concluir nossos estudos, sem nunca deixarem faltar amor e alegria na nossa casa. Meus grandes exemplos, meus amores.

Obrigada por tudo!

Amo vocês!

Agradecimentos

Tenho tanto a agradecer que chega a ser difícil começar. Eu não acreditava estar apta a fazer o doutorado. No entanto, após 4 longos anos estou aqui para defender meu trabalho com meus queridos estolídeos. Desta forma, agradeço a todas as pessoas que me encorajaram a voltar e a continuar a trilhar minha carreira acadêmica e aqueles que me deram força fazendo meus dias mais felizes.

Ao meu melhor amigo, companheiro e marido, Marcelo. Como me encorajou a fazer o doutorado... Agradeço por sempre estar comigo e acreditar mais em mim do que eu mesma acreditava. Obrigada pelo seu entusiasmo ao querer saber do meu trabalho e sempre se importar comigo... por me fazer enxergar tudo por todas as faces possíveis – e são muitas! Obrigada por ter me encontrado e por me fazer ver que é possível construir uma vida com outra pessoa... que, no meu caso, só poderia ser com você. Te amo!

Ao meu menininho, meu irmão, que não aguenta nem ouvir falar em mestrado e doutorado, mas que foi meu mestre e professor por muito tempo. "O engenheiro mais biólogo que existe"!

Aos meus sogros Anne e Léo, a minha cunhada-madrinha Déa e seus filhotes - Tutu e Dudu - e a vovó pelo carinho, pela de sempre preocupação comigo, pelas longas conversas sobre tudo que se possa imaginar: filmes (um dia ainda saberei tantos nomes quanto você, sogrinha), carros, currículos, comida, lubrificantes (quantas aulas, né sogrinho?), filosofia de vida, filhos... Com certeza, aprendi muito com vocês! Obrigada por fazerem parte da minha vida. Ganhei novos pais, uma avó e a irmã que sempre quis ter.

Aos meus primos-irmãos-amigos-afilhados!!!! Marcito e Camila; Ive, Rô e meu presentinho, a Clarinha; Leo e Amandinha. "Foi muito bom... estar com vocês... brincar com vocês..." e o resto da música nós não cantamos porque não lembramos, só a Ive. Meu coração está com vocês no Canadá, em Curicica ou em qualquer lugar do mundo. Obrigada pela força de sempre! Amo vocês demais da conta! Pra sempre!

Agradeço aos meus queridos da família LaBiM: labinianos, ex-labinianos e membros honorários, que fizeram parte desta longa jornada. Carol, Maysinha, Eliane, Érika, Elisa, Ana Cristina, Pri, Taíssa, Gabi, Gabizinha, Joab, Jaque 1, Evelin, Melzita, Val, Ana Carolina, Grazi, Sabrini, Kassia, Keysson, Candida, Val, Anderson, Mateusinho, Mateuzito, Douglas, Rui, Fabinho, Rodrigo, Vanessa, Aline, Daniel, Duda, Julia, Francisco, Rafael e Wilber. Espero ter lembrado de todos! Muito obrigada pelo ambiente agradabilíssimo de trabalho, pelos cafés matinais com pão e mortadela (não é mesmo, Eliane?!), pelas noites não dormidas no laboratório (Ah... Carolzinha e Wilber! Só vocês mesmos, para toparem esta empreitada...), pelas conversas animadoras e por todas as horas de relaxamento na nossa famosa mesa azul. Afinal, canja tem ou não tem que ter hortelã, Érika? E a lasanha de berinjela, existe Joab? Foi um prazer inenarrável trabalhar com vocês por todos estes anos. Levarei comigo muitos amigos daqui. Uma vez LaBiM, sempre LaBiM.

- "Anaaaaaa, vamos no meu ou no teu possante amanhã?!"

Em especial agradeço a Ana Cristina ("euzinha, plena!"), minha dupla, companhia das 6:30 da manhã, meu neurônio da memória quando os meus não funcionavam mais... Obrigada por ter sido parte de mim enquanto eu estava no LBNA com o CG e seus aliados do mal. Aprendemos muito juntas — até a dirigir! — e ainda aprenderemos mais. Você com certeza vai longe! Muito obrigada!! Adoro!

Ao LBNA por terem me acolhido e me ensinado a grande arte de operar o CG. Agradeço em especial ao professor Alexandre Torres por ter me orientado nesta parte do trabalho e a Laís, a Aline e ao André por estarem na bancada comigo brigando com o CG e seus milhões de manuais quando ele resolvia não funcionar. Ô equipamento sentimental, esse!! Aprendi muito com vocês. Muito obrigada!

Agradeço aos meus orientadores, Denise Freire e José André Cavalcanti pela confiança, entusiasmo com cada resultado que eu apresentava, por suas sempre prontas respostas e por terem me permitido trabalhar sob suas supervisões.

Em especial, agradeço a Denise pelos quase 10 anos de convívio (faltam só alguns meses) e por sempre ter um tempinho para falar comigo, nem que seja no caminho até o elevador! Obrigada por ter acreditado nesta bióloga, que bateu à sua porta sem nenhuma

carta de referência, e sem nem saber o que era uma fermentação no estado sólido. Obrigada por ter me permitido fazer parte deste "LARboratório" que é o LaBiM – Sob a sua direção, não poderia ser um local menos apreciado por todos.

Aos "meus meninos": Felipe, Danilo, Claudio, Simão, Zheng, Paulinho (que saudade que você deixou, amigo!) e Vitor, e as "minhas biólogas": Laura, Gui (metade da minha amora), Coelha e meu outro eu. Obrigada pelas saídas da rotina que só vocês poderiam proporcionar. Por entenderem meus sumiços e por estarem sempre por perto. Adoro vocês, meus amigos!!

As minhas amigas desde... muuuito tempo! Carol, Rita, Heze, Juju, Ivete, Thalli e Dani. Minha vida não seria a mesma sem vocês! Crescemos juntas e apesar de não estarmos mais o dia todo perto uma das outras, sinto uma parte de cada uma de vcs dentro do meu coração. Amo vcs, meninas!

Agradeço aos <u>muitos</u> impostos pagos por todos nós, brasileiros, que me permitiram ter uma educação pública por toda a minha vida e por ter uma pós-graduação com direito à bolsa. Quiséramos nós ter o poder de definir para onde vai todo o dinheiro que é retirado de nossos salários. Afinal, com tanta arrecadação, não era para o Brasil estar passando pela atual conjuntura de crise. Neste contexto, agradeço à coordenadora do programa Químico do Petróleo, Prof^a Jussara Miranda e a Cláudia Caruso por sempre correrem atrás de zilhões de termos de compromisso para que não ficássemos sem bolsa neste período difícil que o Brasil passou/ está passando. Muito obrigada pelo empenho de vocês!!

A Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis (ANP) e ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (MCTI), pela bolsa concedida e, a Petrobras e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq), pelo financiamento deste projeto.

Duarte, Jaqueline Greco. Produção e caracterização de um novo biolubrificante obtido por hidroesterificação enzimática a partir do óleo de mamona. Tese (Doutorado em Bioquímica) Instituto de Química, Departamento de Bioquímica - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Lubrificantes possuem um grande mercado consumidor e produtor. No entanto, não são biodegradáveis e cada 1 L de lubrificante pode contaminar 1.000.000 L de água potável. Assim, torna-se necessária a busca por soluções que permitam o desenvolvimento de óleos ambientalmente compatíveis, como ésteres orgânicos biodegradáveis (biolubrificantes). O objetivo deste trabalho foi estudar a produção de novos biolubrificantes, por hidroesterificação enzimática (catalisado por lipases), utilizando como matéria-prima o óleo de mamona (OM). Foram utilizadas sementes de mamoneira como biocatalisador da hidrólise do OM produzindo 97,8% de ácidos graxos livres de mamona (AGLM), ricos em ácido ricinoléico (AR), após 1 h de reação. As lipases comerciais de *C. rugosa,* Lipomod 34 MDP®, (CRL) foram empregadas para catalisar as reações de esterificação dos AGLM com diferentes poliálcoois: neopentilglicol (NPG), trimetilolpropano (TMP), pentaeritritol (PE). A CRL catalisou a redução da acidez em 80% com NPG e TMP e 70% com PE, após 96 h. Na ausência de poliálcool a CRL foi capaz de sintetizar oligômeros de AGLM (estolídeos). Análises de ressonância magnética nuclear (RMN) confirmaram a preferência da CRL pela formação dos estolídeos utilizando o ácido ricinoléico em detrimento dos outros substratos. A análise do teor de AR (% m/m), por cromatrografia gasosa, permitiu conhecer o seu perfil de consumo durante a reação de síntese de estolídeos e propor uma correlação com a diminuição da acidez total no meio reacional (% m/m). O estudo do teor de água na reação de formação de estolídeo revelou que o teor de 15% m/m produziu uma redução de 70% da acidez em 14 h com consumo total do AR livre e grau de polimerização de 6/7. Análises de cromatografia de exclusão por tamanho (GPC ou SEC) e de RMN, objetivando calcular o número de estolídeo (NE), foram realizadas para os estolídeos livres. Elas mostraram que entre 8 e 14 h de reação, houve aumento do grau de polimerização e da quantidade das diferentes frações de estolídeos [dímeros, trimeros, tetrâmeros e pentâmeros(+)]; de 14 à 24 h, apesar do perfil não alterar significativamente, o NE aumenta conforme o tempo reacional o que corresponde ao aumento do índice de viscosidade e da estabilidade oxidativa e na diminuição do ponto de fluidez e índice de acidez total. Foi realizada também a otimização da reação por planejamento experimental (DCCR) que permitiu diminuir o tempo de consumo total do AR para 5 h, utilizando temperatura de 45 °C, 14,4% m/m de água e 1,61% m/m de CRL. A etapa de otimização levou a um aumento de produtividade (2,8 vezes) e diminuição da concentração de enzima (2,5 vezes) com a obtenção de um estolídeo com propriedades similares ao obtido em 14 h: índice de viscosidade, 142; estabilidade oxidativa, 48 min; e ponto de fluidez, -42°C. Estudos preliminares da produção de estolídeos acabados, isto é com todas as terminações livres esterificadas, por esterificação com etanol (EtOH) e 2-etil-1-hexanol (2EH) foram realizados. O preparado enzimático comercial Novozymes 435 foi um bom catalisador atingindo 2,3 % (EtOH) e 1,8% m/m da acidez total do meio (2EH) em 6 e 24 h, respectivamente. Neste trabalho foi possível gerar biolubrificantes que se inserem no contexto das tecnologias verdes, e que poderão ser utilizados como biolubrificantes acabados, óleos básicos e aditivos.

Palavras chave: biolubrificante, ácido ricinoléico, óleo de mamona, CRL, estolídeos.

Duarte, Jaqueline Greco. Production and characterization of a new biolubricant obtained by enzymatic hydroesterification from castor oil. Thesis (Doctor of Biochemistry), Chemistry Institute, Biochemistry Department, Federal University of Rio de Janeiro, 2018.

Lubricants have a large consumer and producer market. However, they are not biodegradable and 1 L of lubricant can contaminate 1,000,000 L of potable water. Thus, it is necessary to search for solutions that allow the development of environmental friendly oils, such as biodegradable organic esters (biolubricants). The objective of this work was to study the production of new biolubricants by enzymatic hydrolysis (catalyzed by lipases) using castor oil (CO) as the raw material. Castor seeds were used as a biocatalyst for CO hydrolysis, producing 97.8% of castor oil free fatty acids (COFFA), rich in ricinoleic acid (RA), after 1 h of reaction. The comercial prepared of C. rugosa lipases (CRL) were used to catalyze the esterification reactions of the AGLM with different polyols: neopentylglycol (NPG), trimethylolpropane (TMP), pentaerythritol (PE). The CRL reduced acidity by 80% with NPG and TMP, and 70% with PE after 96 h. In the absence of polyol the CRL was able to produce AGLM oligomers (estolides). Nuclear magnetic resonance (NMR) analyzes confirmed the preference of CRL for the formation of estolides using ricinoleic acid over other substrates. The analysis of the RA content (% w/w), by gas chromatography, revealed its consumption profile during the reaction of estolide synthesis and to propose a correlation with the decrease of the total acidity in the reaction medium (% w/w). The study of the water content in the estolide formation reaction revealed that a content of 15% m/m produced a 70% reduction in acidity in 14 h with total free RA consumption and degree of polymerization of 6/7. Gel permeation chromatography (GPC) and NMR analyzes aiming for estolide number (EN) were performed showing an increase in the polymerization degree and in the amount of different estolide fractions [dimers, trimeros, tetramers and pentamers (+)] from 8h to 14 h of reaction. From 14 h to 24 h of reaction, although the profile does not change significantly, the EN increases according to the reaction time, resulting in an increase in the viscosity index and oxidative stability and a decrease of the pour point and total acidity index. The optimization of the reaction by experimental design (DCCR) was also carried out, which reduced the time of total RA consumption to 5 h, using a 45 °C temperature, 14.4% w/w water and 1.61% w/w CRL. The optimization step led to an increase in productivity (2.8 times) and a reduction in enzyme concentration (2.5 times) with an estolide whose properties are similar to that obtained with 14 h: 142 of viscosity index; 48 min of oxidative stability; and -42 °C pour point. Preliminary studies on the production of ethanol-esterified (EtOH) and 2-ethyl-1-hexanol (2EH) esterified stolides were performed. The commercial enzyme Novozymes 435 was a good catalyst, reaching 2.3% (EtOH) and 1.8% w/w of the total acidity of the medium (2EH) in 6 and 24 h, respectively. In this work, it was possible to generate biolubricants that are inserted in the green technologies context, and that can be used as finished biolubricants, basic oils and additives.

Key words: biolubricant, ricinoleic acid, castor oil, CRL, estolides.

Lista de figuras

Figura 1 Fluxograma da cadeia de produção de lubrificantes (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b)14
Figura 2 Representação das posições alílicas e bisalílicas em óleo vegetais (PETROVIC, 2008).
Figura 3 Decomposição de um éster com a presença de um hidrogênio β (circundado) por um mecanismo cíclico de baixa energia31
Figura 4 Decomposição de um éster na ausência de um hidrogênio β por um mecanismo de alta energia31
Figura 5 Molécula de Triacetina - hidrogênio β circundado (A); Molécula de Acetil-TMP (B) (adaptado de SILVA, 2012)32
Figura 6: Estrutura química do ácido ricinoléico35
Figura 7 Ciclo de vida de lubrificantes produzidos de fontes renováveis (WILLING, 2001)38
Figura 8 Exemplos dos principais ésteres utilizados como biolubrificantes39
Figura 9 Esquema hipotético de uma reação de hidrólise (sentido direto) de um triacilglicerol
catalisada por lipases ou esterases produzindo glicerol e ácidos graxos (R¹ = ou ≠ R² = ou ≠ R³
= ou \neq R ¹ R ¹ < 8 átomos de carbono)
Figura 10 Esquema representando exemplos de reações catalisadas pelas lipases (modificado
de PAQUES; MACEDO, 2006)
Figura 11 Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> em suas configurações de tampa aberta e fechada
(RODRIGUES et al., 2013)45
Figura 12 Esquema representando o mecanismo de uma reação de hidrólise de éster
catalisada por esterases e lipases. O substrato (éster) bem como os produtos da reação (ásido carbovílico o álcool) ção aprocentados em vermelho. Por sua vez, a tríado catalítica e a
(ácido carboxílico e álcool) são apresentados em vermelho. Por sua vez, a tríade catalítica e a água estão em preto e, em azul, são representados os resíduos do buraco do oxiânion. As
etapas (a), (b), (c), (d) e (e) estão explicadas no texto que precede a figura (ALMEIDA, 2005
modificado de JAEGER et al., 1994)49
Figura 13 Estruturas moleculares dos poliálcoois: neopentilglicol (NPG), trimetilolpropano
(TMP) e pentaeritritol (PE)56
Figura 14 Esquema representando um estolídeo livre de ácido ricinoléico no qual "n" pode
assumir valores a partir de "0". As setas indicam o terminal carboxílico e a hidroxila livre por
onde o estolídeo pode continuar o processo de polimerização60
Figura 15 Exemplo da formação de um estolídeo triglicídico a partir da reação de
esterificação entre o óleo de Lesquerella e o ácido láurico (modificado de ISBELL et al., 2006)
Figura 16 Comparação entre a oxidação relativa de ácidos graxos com o mesmo número de
carbonos (C18) variando a quantidade de duplas ligações e, portanto, a presença de
hidrogênios alílicos. Da esquerda para a direita taxa de oxidação relativa: estearatos:
oleatos: linoleatos: linolenatos = 1: 10: 100: 20074

Figura 17 Exemplo de ataque oxidativo ao hidrogênio bisalílico presentes nos ácidos graxos
com duplas conjugadas
Figura 18 Hidrólise do óleo endógeno às sementes de mamona. As sementes de mamona
(360 U/g) foram trituradas em mixer junto com tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,0, na
razão semente/tampão de 1:5 (m/v). Após trituração, a mistura foi incubada à 30 °C sob
agitação (tempos de 0,25 a 24 h)96
Figura 19 Hidrólise endógena x Hidrólise do óleo de mamona. Esta figura trata da
comparação entre hidrólise apenas do óleo endógeno (presente nas sementes ou com óleo
de mamona extra adicionado no processo. Para ambos os procedimentos de hidrólise, as
sementes de mamona (com atividade lipásica de 226 U / g) foram trituradas em mixer, junto
com tampão, 0,1 M, pH 4,0, na razão semente/tampão /óleo de 1:5:5 (m/v/v). Após a
trituração, a mistura foi incubada a 30 °C, sob agitação magnética constante. O óleo foi
extraído e a sua acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,04 M97
Figura 20 Comparação entre o AGLM obtido por hidrólise enzimática (A); comercial (B) e o
óleo de mamona (C)100
Figura 21 Conversão (% AGLM) das reações de síntese de ésteres catalisadas pelas lipases
RM-IM, CALB e CRL. Todas as enzimas foram utilizadas numa concentração de 4% (m/m de
AGLM). As reações descritas em 6.2 foram conduzidas em reatores encamisados a 40 °C,
com agitação constante, usando AGLM e os poliálcoóis: NPG (2,5:1), TMP (3,75:1) ou PE
(5:1)
Figura 22 Conversão (expressa como % dos AGLM que foram esterificados) da reação de
síntese de biolubrificantes catalisada pela CRL a 4% m/m do AGLM. As reações foram
conduzidas na presença e ausência de 1% de água, a 40 °C, em leito agitado, empregando
como substrato os AGLM e os poliálcoois NPG (2,5:1), TMP (3,75:1) ou PE (5:1). Alíquotas
foram retiradas em 24 e 94 h e foram analisadas pelo método titulométrico para
posteriormente ser calculada a conversão dos AGLM (% AGLM)111
Figura 23 Conversão (expressa como % das hidroxilas do álcool que foram esterificadas) da
reação de síntese de biolubrificantes catalisada pela CRL a 4% m/m dos substratos. As
reações foram conduzidas na presença e ausência de 1% de água, a 40 °C, em leito agitado,
empregando como substrato os AGLM e os poliálcoois NPG (2,5:1), TMP (3,75:1) ou PE (5:1).
Alíquotas foram retiradas em 24 e 94 h e foram analisadas pelo método titulométrico, para
posteriormente ser calculada a conversão (% hidroxilas esterificadas)
Figura 24 Síntese de biolubrificantes a partir de AGLM e PE utilizando a CRL em quatro
condições distintas: ausência e presença de 1, 3 e 5 % m/m de água. As reações foram
conduzidas em reatores encamisados a 40 °C, com agitação magnética constante por 68 h.
Figura 25: Resultado da acidez (expresso como % m/m AGLM) da reação controle e sem
enzima (CRL). As reações foram conduzidas empregando como substrato os AGLM e a 4 %
(m/m do AGLM) durante 163 h à 40 °C, em reator de leito agitado115
Figura 26 Conversão (% AGLM) da síntese de ésteres com poliálcoois totalmente
solubilizados catalisados pela CRL 4% m/m de AGLM. As reações de síntese de

biolubrificantes foram conduzidas a 40 °C por 96 h em reatores encamisados com agitação constante. A razão molar AGLM:NPG e TMP foi de 2,5:1 e 3,75:1, respectivamente
cromatograma pertencem aos demais ácidos presentes nos AGLM139
Figura 29 Cromatograma do ponto de 18 h da reação de formação de estolídeos. Os picos
assinalados correspondem ao padrão interno C:17 (<i>Peak</i> 1) e ao ácido ricinoléico (<i>Peak</i> 2). Se
observa que os demais ácidos presentes, assim como o ácido ricinoléico diminuem,
indicando que todos os AGLM foram utilizados na formação de estolídeos seja como
terminadores das cadeias poliméricas, na porção alcoólica140
Figura 30 Associação entre o ácido ricinoléico livre (ARL) e a acidez total da amostra. Os
gráficos mostram a relação não linear entre as variáveis (A); e a regressão linear logarítma,
transformada das curvas de ácido ricinoléico livre (ARL) e acidez total (AT) (In ARL=0,0625AT-
0,6789; R ² = 0,9873; P< 0.0001)142
Figura 31 Representação das ligações éster utilizadas para calcular o NE: -C–O–C- como #1 e
-C-OH como #2
Figura 32 Cinética da reação de formação de estolídeos, avaliado pelo NE (A) e perfil de
polimerização (B). O NE aumentou de forma não-linear com o tempo sendo o aumento de 8
às 14 h proeminente com relação aos demais. Cada tempo reacional representou um perfil
diferenciado de estolídeos livres sendo a partir de 14 h predominante a fração de
pentâmeros (+) cujo NE auxilia na determinação da maior molécula de estolídeos formada.
145
Figura 33 (A) reações de esterificação do terminal carboxílico dos estolídeos de 14 h com a utilização de etanol (EtOH). (B) reações de esterificação do terminal carboxílico dos
estolídeos de 14 h com a utilização de 2-etil- 1- hexanol (2-EH). As reações foram
conduzidas com a razão molar de 1:1,5 utilizando 10 g de estolídeo e 4 % m/m de enzima, a
40 °C e agitação constante. O controle reacional foi realizado com a CRL e o estolídeo de 14
h sem a presença de álcool150
Figura 34 Efeitos padronizados da conversão de ácido ricinoléico em estolídeos167
Figura 35 Superfície de resposta para a CAR. (A) temperatura e enzima variando em função da água no ponto central; (B) temperatura e água variando em função da enzima no ponto
central: (C) água e enzima em função da temperatura constante no nonto central

Lista de Tabelas

Tabela 1 Classificação ATIEL/API dos tipos de óleos básicos (ROCCO et al., 2016; LUBRIZOL, 2002)16
Tabela 2 Comparação entre as características dos óleos parafínicos e naftênicos (adaptado de ROCCO et al., 2016; DO BRASIL et al., 2012 e SILVA, 2012)
Tabela 3 Composição percentual (%) dos ácidos graxos mais comuns encontrados nos óleos vegetais mais utilizados para a produção de lubrificantes (ROCCO et al., 2016)
Tabela 4 Biodegradabilidade primária de óleos básicos medida pelo método CEC-L-33-A-93 (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a)70
Tabela 5 Comparação entre a composição de ácidos graxos livres (AGLs) obtidos por hidrólise
enzimática (próprio) e o comercial99 Tabela 6 Atividades lipásicas das enzimas CRL, CALB e RM-IM realizadas segundo
metodologias descritas no tópico 6.1107 Tabela 7 Resultados das análise de RMN do sobrenadante obtido após centrifugação da
reação de AGLM, CRL (4 % m/m) com NPG, TMP e PE e na ausência de poliálcoois, conduzida por 96 h a 40 °C sob agitação magnética constante117
Tabela 8 Análise de RMN do sobrenadante obtido da centrifugação da reação entre AGLM,
CRL (4 % m/m dos substratos) com NPG e TMP (solubilizados previamente) conduzida por 24 h a 40 °C sob agitação mecânica constante121
Tabela 9 Propriedades lubrificantes do óleo de mamona, comparado aos produtos das reações de esterificação entre: AGLM próprio com NPG e TMP (razões molares de 2,5: 1 e
3,75: 1, respectivamente); e, sem poliálcoois, usando AGLM comercial e próprio. Todas as reações foram catalisadas pela CRL a 4% m/m de AGLM e estão descritas em 6.5.1 e 6.5.2.
Tabela 10 Características lubrificantes de produtos encontrados na literatura124 Tabela 11 Acidez total e teor de água (%) à 0, 24 e 120 h das reações de formação de
estolídeos com adições de água variando de 1-15% (m/m)
ARL, e preditos pela equação da regressão linear logarítma (InARL=0,0625AT-0,6789) com
base na acidez total da amostra143 Tabela 13 Caracterização quanto às características lubrificantes dos diferentes estolídeos
livres obtidos em 6, 14 e 20 h de reação e suas comparações com os estolídeos obtidos pela reação do estolídeos de 14 h com etanol e 2-etil-1-hexanol. A reação de formação de
estolídeos foi feita utilizando AGLM, CRL (4% m/m) e água (15% m/m), a 40 °C sob agitação mecânica de 200 rpm. O NE foi realizado por RMN descritas em 7.3.1, a conversão dos ARL
em estolídeos conforme descrito em 7.6.2 e as demais análises de caracterização estão
doccritac na 4 2 2

Tabela 14 Propriedades de alguns óleos básicos/aditivos comerciais utilizados em
proporções variadas para a composição do lubrificante final de interesse (CERMAK; ISBELL,
2001)159
Tabela 15 Valores reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR164
Tabela 16 Matriz de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com os valores
codificados das variáveis e os valores da conversão do ácido ricinoléico (CAR), calculada em 4
h, para cada ensaio realizado165
Tabela 17 Coeficientes de regressão para a resposta CAR do DCCR. Os termos lineares estão
indicados pela letra L e os termos quadráticos pela letra Q. Em negrito estão destacados os
efeitos estatisticamente significativos166
Tabela 18 Coeficientes de regressão com efeitos estatisticamente não significativos
ignorados168
Tabela 19 Teste de análise de variância (ANOVA) do DCCR para a conversão máxima do acido
ricinoléico em estolídeos168
Tabela 20 Valores críticos sugeridos pelo DCCR para se obter as maiores conversões do ácido
ricinoléico em estolídeos172
Tabela 21 Otimização das condições pré-selecionadas pelo DCCR sendo a CAR calculada com
base no ARL em 2 h de reação173
Tabela 22 Caracterização quanto às características lubrificantes dos estolídeos obtidos na
reação não otimizada, realizada a 40 °C, 4 % m/m de CRL e 15 % m/m de água e sua
comparação com os estolídeos obtidos pela reação otimizada a 45 °C, 1,61% m/m de CRL e
14,4 % m/m de água. As análises de caracterização estão descritas na sessão 4.2.2178

SUMÁRIO

1	Intr	oduç	ção	1
2	Obj	jetivo	OS	5
	2.1	Obj	etivo geral	5
	2.2	Obj	etivos específicos	5
3	Rev	/isão	Bibliográfica	8
	3.1	Lub	rificantes	8
	3.1	.1	Mercado de lubrificantes	10
	3.1	.2	Lubrificantes acabados	13
	3.2	Óle	os básicos	15
	3.2	.1	Classificação dos óleos básicos	15
	3.3	Óle	os vegetais	25
	3.3	.1	Aplicação na produção de lubrificantes	26
	3.3	.2	Insaturações na porção acil	29
	3.3	.3	Hidrogênio β à ligação éster	30
	3.3	.4	Óleo de mamona	33
	3.3	.5	Ácido ricinoléico	34
	3.4	Bio	lubrificantes	36
	3.5	For	mas de obtenção de biolubrificantes	39
	3.6	Lipa	ases e esterases: mercado de enzimas	40
	3.6	.1	Lipases e esterases: características gerais	41
	3.6	.2	Estrutura e mecanismo de atuação	45
	3.6	.3	Classificação da especificidade das lipases	50
	3.6	.4	Lipase/esterase de Candida rugosa	51
	3.7	Apl	icação de enzimas na produção de biolubrificantes	54
	3.8	Poli	iolésteres	55
	3.9	Est	olídeos	59
	3.10	Sínt	tese de estolídeos	63
	2.1	Λ 1	Catálica química	<i>C</i> 1

	3.1	10.2	Catálise enzimática	66
	3.11	Prir	cipais propriedades dos lubrificantes	68
	3.1	1.1	Propriedades químicas	68
	3.1	1.2	Propriedades físicas	78
4	Ma	ateria	s e metodologia comum	84
	4.1	Ma	teriais	84
	4.2	Me	todologia	85
	4.2	2.1	Análise de detecção de ácidos graxos livres (AGL)	85
	4.2	2.2	Propriedades físicas e funcionais dos biolubrificantes	85
5	Es	tudo d	las condições de hidrólise do óleo de mamona	90
	5.1	Det	erminação da atividade hidrolítica das sementes de mamona	90
	5.1	L. 1	Extrato acetônico das sementes de mamona	90
	5.1	L. 2	Ensaio de atividade hidrolítica	91
	5.2 (AGL		rólise do óleo de mamona e recuperação dos ácidos graxos livres de mamona	
	5.2	2.1	Hidrólise do óleo de mamona	91
	5.2	2.2	Recuperação dos AGLM	92
	5.3	Cro	matografia gasosa	93
	5.3	3.1	Metilação dos Ácidos Graxos Livres para Análise por Cromatografia Gasosa.	93
	5.3	3.2	Análise da Composição em Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa	93
	5.4	Res	ultados	94
	5.4	l.1	Hidrólise do óleo de mamona	94
	5.4	1.2	Comparação entre o AGLM obtido e o comercial	99
6	Es	tudo d	la produção de biolubrificantes com polialcoóis	101
	6.1	Det	erminação das atividades lipásicas	101
	6.1	L. 1	Atividade hidrolítica	101
	6.1	2	Atividade de esterificação	102
	6.2	Este	erificação dos AGLM	102
	6.2	2.1	Avaliação de diferentes enzimas	102
	6.2	2.2	Aplicação da enzima CRL na esterificação dos AGLM	103
	6.3	Cál	culo da conversão dos AGLM em ésteres	103
	6.4	Aná	lise dos produtos da reação por ressonância magnética nuclear (RMN)	104

	6.5	Auı	mento de escala para avaliação das características lubrificantes	105
	6.	.5.1	Avaliação dos produtos derivados dos poliálcoois	105
	6.	.5.2	Caracterização da reação controle	106
	6.6	Res	sultados	107
	6.7	Sel	eção das enzimas	107
	6.	.7.1	Atividades enzimáticas	107
	6.	.7.2	Avaliação de diferentes enzimas na esterificação dos AGLM	108
	6.8	Pro	dução de biolubrificantes derivados de poliálcoois pela CRL	110
	6.9	Ava	aliação da variação da concentração de água na reação de AGLM e PE	113
	6.10) Ava	aliação da produção de estolídeos dos AGLM na reação controle	114
	6.11	l Ana	álises de RMN dos produtos das reações	116
	6.12	2 Efe	ito da solubilização dos poliálcoois	119
	6.13	3 Cai	racterização dos produtos quanto as suas propriedades lubrificantes	122
7	Es	studo	da produção de estolídeos lubrificantes livres e acabados	126
	7.1	Est	erificação dos AGLM	126
	7.	.1.1	Efeito da adição de água e cinética da produção de estolídeos	126
	7.	.1.2	Estudo preliminar da esterificação para formação dos estolídeos acabados	127
	7.2	Ana	álise do teor de água	128
	7.3	Ana	álises de caracterização química dos produtos obtidos	128
		.3.1 stolíde	Análise de ressonância magnética nuclear para determinação do número o	
		.3.2 or GPC	Análise de determinação do perfil de massa molar das amostras de estolíd C 129	eos
	7.4	Ava	aliação das propriedades dos estolídeos livres em diferentes tempos após	
	ciné	ética		130
	7.5	Ava	aliação das características dos estolídeos acabados	130
	7.	.5.1	Produção do estolídeo com 14 h de reação	130
	7.	.5.2	Reações de esterificação do terminal carboxílico para caracterização	131
	7.6 gaso		álise do conteúdo de ácido ricinoléico livre no meio reacional por cromatogra G)	
	7.	.6.1	Derivatização do ácido ricinoléico livre	132
	7.	.6.2	Análise dos ésteres isopropilados de ácidos graxos por cromatografia gas o 133	ısa

	7.7	Res	ultados	134
	7.8	Efe	ito da concentração de água na produção de estolídeos pela CRL	134
	7.9	Cin	ética de formação de estolídeos	137
	7.	9.1	Relação entre a acidez e a concentração de ácido ricinoléico	141
	7.	9.2	Alongamento do estolídeo durante a reação	143
	7.10) Esti	udo preliminar da esterificação para formação de estolídeos acabados	147
	7.11	Car	acterização dos estolídeos livres e acabados	151
	7.	11.1	Índice de acidez total (IAT)	154
	7.	11.2	Viscosidades a 40 e a 100 °C	154
	7.	11.3	Índice de viscosidade (IV)	155
	7.	11.4	Ponto de fluidez (PF)	156
	7.	11.5	Estabilidade oxidativa (EO)	157
	7.	11.6	Comparação com produtos comerciais	159
8	Es	studo d	da otimização da reação de produção de estolídeos lubrificantes livres	161
	8.1	Inve	estigação das condições de produção de estolídeos	161
	8.	1.1	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	161
	8.	1.2	Avaliação do efeito da temperatura na reação	162
	8.	1.3	Cinética de produção de estolídeos otimizada	162
	8.2	Reu	ıso da enzima	162
	8.3	Car	acterização dos estolídeos livres após otimização da reação	163
	8.4	Res	ultados	164
	8.5	Inve	estigação dos parâmetros da reação de produção de estolídeos	164
	8.	5.1	Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	164
	8.	5.2	Avaliação das melhores condições reacionais	172
	8.	5.3	Avaliação das características lubrificantes	177
9	C	ONCLU	JSÕES	180
10		PERSE	PECTIVAS	182
11		REFER	RÊNCIAS	183

Capítulo 1

1 Introdução

Os lubrificantes minerais, óleos derivados do petróleo, são exemplos claros de produtos úteis, porém, perigosos ao meio ambiente (MMA; CONAMA, 2005; ORI-JESU; ORI-JESU, 2009). O aumento do rigor legislativo das normas ambientais e dos preços do óleo cru devido à diminuição das reservas de petróleo tem conduzido à substituição gradual dos óleos minerais por óleos sintéticos e óleos sintéticos provenientes de fontes renováveis (AZIZ et al., 2014; KANIA et al., 2015; PANCHAL et al., 2017). Estes últimos, conhecidos também como biolubrificantes, podem ser obtidos por catálise química (MCNUTT; HE, 2016) ou enzimática (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012).

O mercado mundial de lubrificantes acabados constitui menos de 1% da entrada de óleo cru nas refinarias, o que significa cerca de 36.000.000 toneladas por ano, com os biolubrificantes representando aproximadamente 2% deste (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; BARTZ, 1998). A previsão é de que o mercado de lubrificantes alcance 49.300.000 toneladas até o ano de 2022 com crescimento de 2,8% ao ano (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014a, 2014b). Enquanto o mercado de lubrificantes acabados de base mineral se encontra praticamente estagnado, os biolubrificantes vêm apresentando um crescimento médio de 10% ao ano nos últimos 10 anos alertando para a importância de mais aporte de recursos para o desenvolvimento e consolidação desta tecnologia (EHRAN et al., 2008; SOARES, 2013a).

Os biolubrificantes são ésteres orgânicos biodegradáveis, que podem ser decompostos, em até um ano, por meio da metabolização microbiana. Os principais ésteres utilizados como biolubrificantes são ftalatos, diésteres, C36 dimeratos, trimetilatos e ésteres produzidos da reação entre ácidos mono ou dicarboxílicos e poliálcoois (álcoois polihidroxilados) que também são conhecidos como poliolésteres (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; ROCCO et al., 2016). Os poliolésteres vêm sendo estudados devido a serem produtos com boa estabilidade, pois têm presença de um átomo de carbono quaternário assim como à ausência de um hidrogênio secundário na posição β à hidroxila (MOULOUNGUI; PELET, 2001). Ambas características, que trazem maior interesse para os

poliolésteres, também podem ser encontradas em oligômeros de ácidos graxos conhecidos como estolídeos.

De uma forma geral, lubrificantes apresentam propriedades físico-químicas que variam de acordo com a aplicação para a qual são formulados. Algumas destas, como a estabilidade oxidativa, são extremamente importantes e, no caso de óleos vegetais, esta propriedade é bastante insatisfatória (CERMAK; ISBELL, 2003; PULLEN; SAEED, 2012). Isto ocorre, pois, à medida que se sintetiza uma molécula altamente resistente à oxidação, com as duplas ligações removidas ou protegidas por impedimentos estéricos, deve-se levar em consideração que a ação dos micro-organismos responsáveis pela sua biodegradação também será dificultada (SILVA, 2012). Assim, o grande desafio da produção de um biolubrificante reside no fato de se tentar encontrar um equilíbrio, ou seja, uma molécula que tenha alta resistência à oxidação e seja simultaneamente biodegradável.

Dentro do contexto da produção dos biolubrificantes por tecnologia enzimática, destacam-se como biocatalisadores as lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 – IUPAC). Estas enzimas atuam, geralmente, em interface orgânico-aquosa, catalisando a hidrólise da ligação éster de triacilgliceróis formando ácidos graxos livres e triacilglicerol (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Em ambientes aquo-restritos, estas podem atuar em diversas reações de síntese como a esterificação e a transesterificação (GOTOR-FERNÁNDEZ; VICENTE, 2007). Justamente pela importância das reacões de síntese para a indústria petroquímica, a aplicação das lipases vem crescendo progressivamente, como na produção de biodiesel (AGUIEIRAS et al., 2014; BISEN; SANODIYA, 2010; SOUZA et al., 2009) e de biolubrificantes (DA SILVA et al., 2015, LAGE et al. 2016). No caso específico da produção de biolubrificantes, a enzima comercial de Candida rugosa tem sido relatada como um catalisador específico para a utilização em derivados de mamona, seja para a produção de oligômeros de ácido ricinoléico conhecidos como estolídeos (BÓDALO et al., 2005) como para a produção de biolubrificantes a partir do biodiesel metílico de mamona e trimetilolpropano, reação na qual se obteve conversões altas (~98%) quando comparada à mesma reação via catálise química (~60%) (DA SILVA et al., 2015).

O óleo de mamona é proveniente da prensagem das sementes da mamoneira (*Ricinus communis*) planta presente em todo o território brasileiro sendo destaque na produção brasileira (MCKEON et al., 2016). Atualmente, a hidrólise industrial deste óleo para

produzir ácidos graxos livres é realizada por hidrólise térmica ou química, geralmente usando catalisadores alcalinos (MAHER; BRESSLER, 2007; SALIMON; ABDULLAH; SALIH, 2011), o que pode causar oxidação do produto final. O ácido ricinoléico também pode ser produzido por saponificação seguida de acidificação (SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011). Este último procedimento, apesar das temperaturas amenas em comparação com a hidrólise térmica, fornece um produto com alterações de cor e odor e uma grande quantidade de resíduos (lodo ácido e água dura). O processo de hidrólise catalisado por lipases já vem sendo estudado por diversos autores com vantagens evidentes em relação a qualidade do produto obtido (AVELAR et al., 2013; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2011; DE SOUSA et al., 2010; HERMANSYAH et al., 2007; NOOR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003). O produto da hidrólise deste óleo é composto por 70 - 90% de ácido ricinoléico ou ácido 12hidroxi-9-cis-octadecenóico, que possui estrutura diferenciada por conter uma ligação cisdupla no cabono 9 e uma hidroxila no carbono 12. A estrutura química deste ácido leva o óleo de mamona a ser um óleo naturalmente mais viscoso (DOLL et al., 2017; JÚNIOR et al., 2011). Derivados ésteres do ácido ricinoléico têm sido sugeridos como potenciais biolubrificantes (AZEVEDO; LIMA, 2001; GARCÍA-ZAPATEIRO; VALENCIA; FRANCO, 2014; JÚNIOR et al., 2011; POTULA et al., 2014), porém a sua estabilidade oxidativa é questionada devido à hidroxila livre no carbono 12 do ácido ricinoléico. No entanto, se esta hidroxila for esterificada, como na reação de obtenção de estolídeos, o produto desta reação pode se tornar mais estável (YAO et al., 2010).

Os estolídeos são oligômeros formados a partir da esterificação entre dois ácidos graxos de modo a conservar sempre um terminal carboxílico livre (AGUIEIRAS et al., 2011; BÓDALO-SANTOYO et al., 2005; DOLL et al., 2017). Esta catálise pode ser feita via química, entre diversos ácidos graxos, desde que estes tenham como nucleófilo o carbono de uma ligação dupla ou uma hidroxila livre, no caso dos hidroxiácidos, como o ácido ricinoléico. No entanto, estas reações requerem elevadas temperaturas e pressões, o que prejudica a qualidade do produto final obtido (ISBELL et al., 2000).

Nosso grupo de pesquisa do laboratório de biotecnologia microbiana (LaBiM / UFRJ) tem se dedicado nos últimos anos ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos tais como biodiesel (AGUIEIRAS et al., 2014; CASTRO et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2015) e biolubrificantes (CAVALCANTI et al., 2018; DA SILVA et al., 2015; DA SILVA; HABERT;

FREIRE, 2013; FERNANDES et al., 2017; GRECO-DUARTE et al., 2017) que em conjunto com o conhecimento fornecido pela Gerência de Produtos (PROD) do CENPES/ Petrobras tornou possível o desenvolvimento desta tese.

Deste modo, a presente tese de doutorado descreve o desenvolvimento de um novo processo totalmente realizado por rota enzimática, utilizando lipases, que abordou o estudo da hidroesterificação do óleo de mamona, que consiste na hidrólise do óleo de mamona e na esterificação entre o produto desta hidrólise e dele com diferentes poliálcoois. Este processo se encontra inserido no contexto das Tecnologias Verdes e possibilitou o desenvolvimento e o controle do processo de produção de biolubrificantes do tipo estolídeos para diversas aplicações do mercado, diminuindo a dependência externa na área e podendo significar redução de custos de produção deste insumo.

Capítulo 2

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esta tese de doutorado tem como objetivo desenvolver um processo biocatalítico de obtenção de biolubrificantes com diversas características, que sejam promissores para o mercado de lubrificantes, a partir do óleo de mamona. A proposta é de utilizar o processo de hidroesterificação enzimática, utilizando enzimas comerciais e vegetais (obtidas das sementes dormentes de mamoneira), sendo o processo como um todo baseado nos princípios da química verde.

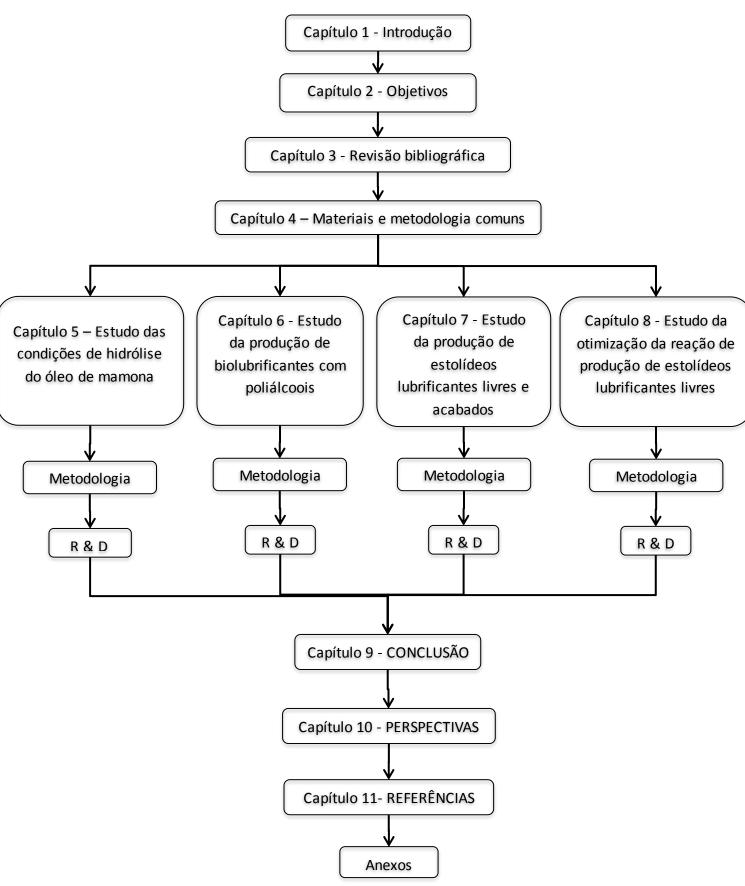
2.2 Objetivos específicos

Para realizar este trabalho, diversos objetivos específicos tiveram de ser cumpridos não necessariamente na ordem que serão apresentados, a saber:

- ✓ Desenvolvimento de uma metodologia que permita hidrolisar o óleo de mamona utilizando as próprias sementes de mamona como biocatalisador.
- ✓ Seleção de enzimas comerciais específicas para a esterificação dos ácidos graxos livres de mamona (AGLM).
- ✓ Desenvolvimento de um método analítico, por cromatrografia gasosa, de detecção do ácido ricinoléico livre no meio reacional.
- ✓ Produção de biolubrificantes a partir da hidroesterificação do óleo de mamona utilizando diferentes poliálcoois.

- ✓ Estudo da produção de estolídeos livres pela lipase comercial de *Candida rugosa*.
- ✓ Estudos preliminares de seleção de enzimas para produção de estolídeos acabados.
- ✓ Otimização da produção de estolídeos livres por planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR).
- ✓ Reuso do biocatalisador na condição otimizada.
- ✓ Caracterização e comparação quanto as propriedades lubrificantes de todos os estolídeos formados.

FLUXOGRAMA DE APRESENTAÇÃO DA TESE



Capítulo 3

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Lubrificantes

Os lubrificantes são óleos de extrema importância para a garantia do bom funcionamento de qualquer maquinário, atuando dentre outros na economia de energia e de combustível, seja no setor de transportes ou em processos produtivos industriais (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

Os primeiros registros do uso de lubrificantes datam de 2006 a.C. no Egito antigo e possivelmente começou com a necessidade de diminuir o atrito no transporte dos blocos necessários para a construção das Esfinges e Pirâmides. Antes disso, como o uso de lubrificantes era desconhecido, os egípcios utilizavam galhos de árvores para arrastar e puxar os trenós com aproximadamente 60 toneladas de blocos. A função dos galhos de árvores era reduzir o atrito de deslizamento entre o trenó e o solo. O primeiro vestígio de óleo lubrificante foi encontrado nas rodas de um "trenó" e foi comprovado que o elemento que estava sendo utilizado era sebo de boi ou de carneiro. Em 1.700 a.C., ainda no Egito antigo, se utilizava, além de gordura animal, água, lama e gordura vegetal para lubrificar os deslizadores dos "trenós" e também os eixos de carruagem (CLARILUB, 2013; WEARCONTROL, 2010).

Seguindo mais adiante na linha do tempo, temos registros do uso de lubrificantes nos jogos olímpicos, na antiga Grécia, desde sua primeira edição em meados de 776 a.C. Uma das modalidades era a corrida de bigas, que também tinham seus eixos lubrificados por gordura animal. Em 200 d.C. os romanos também utilizaram as bigas como meio de transporte, que por sua vez também eram lubrificadas por gordura animal. Nos castelos da Idade Média, entre os séculos V e X, a gordura animal foi utilizada para lubrificar o mecanismo de abertura dos portões e nas rodas das carruagens. Na Noruega, no ano de 780, os vikings construíram os primeiros Drakkars — compridos barcos a vela no qual foi usado o óleo de baleia para lubrificar o suporte de articulação das velas e o eixo do leme. Já no

século XV, com o início das grandes navegações comerciais, o óleo de baleia também foi usado para lubrificar a maquinaria dos navios, como os timões (CLARILUB, 2013).

Desta forma, os primeiros óleos lubrificantes conhecidos utilizados pelos seres humanos foram os óleos de origem animal e também óleos vegetais. No século XIX, os triglicerídeos naturais foram gradualmente substituídos por lubrificantes derivados do petróleo, denominados óleos minerais. O petróleo era conhecido já na antiguidade, devido a afloramentos frequentes no Oriente Médio. Estudos arqueológicos demonstram que foi utilizado há quase seis mil anos pelos árabes. No entanto, a indústria petrolífera que conhecemos hoje, começou a se formar em meados do século XIX. Em agosto de 1859 o americano Edwin Laurentine Drake perfurou o primeiro poço para a procura do petróleo, na Pensilvânia e definitivamente traçou o início da história dos lubrificantes de origem mineral. Estes então foram substituindo àqueles de origem animal e vegetal, pois eram mais baratos e tinham elevada estabilidade térmica - suportavam o calor por mais tempo sem se decompor (SILVA, 2012; LASTRES, 2003; USP, 1999).

Nos dias atuais, apesar da maior parte dos lubrificantes utilizados nas diversas aplicações dos óleos lubrificantes ainda serem de origem mineral, os padrões de qualidade exigidos (como graus de viscosidade, resistência à oxidação, ponto de fluidez), são cada vez mais rigorosos e nem sempre podem ser alcançados com o uso dos óleos minerais convencionais. Com os avanços nas tecnologias de produção de lubrificantes, rotas alternativas de produção dos mesmos vêm sendo desenvolvidas para a obtenção de produtos com maior durabilidade e menor impacto ambiental (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; KANIA et al., 2015; SILVA, 2012; SYAIMA et al., 2015).

Os lubrificantes podem ser classificados como uma substância ou como um grupo de produtos. Como uma substância eles são caracterizados como óleos que possuem diversas propriedades lubrificantes que variam de acordo com a finalidade para a qual são produzidos; são utilizados para facilitar a movimentação de corpos sólidos não somente para diminuir o atrito, mas também o desgaste entre as superfícies que estão interagindo. Quando são classificados como um grupo de produtos, eles desempenham um papel essencial na indústria e no transporte, uma vez que sem lubrificação não há transferência de

energia e qualquer maquinário estaria condenado ao mau funcionamento desde seus primeiros usos (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; PANCHAL et al., 2017).

Dentro do grupo dos lubrificantes existem os fluidos funcionais que são usados em aplicações onde seu propósito principal não somente é atuar na fricção e redução do desgaste, embora seja necessário algum grau de lubrificação, mas também na troca de energia e calor. Exemplos de tais aplicações são os fluidos de transformadores, os fluidos de transferência de calor, os fluidos hidráulicos e os fluidos de refrigeração para metais. Além da ampla aplicação em motores, engrenagens e fluidos hidráulicos, existem milhares de outras formulações de lubrificantes ou graxas especificamente personalizadas que diferem muito, tanto químicamente quanto fisicamente (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; KANIA et al., 2015).

Sendo assim, lubrificantes são responsáveis pela redução de atrito e desgaste, além de manter limpo e refrigerar os equipamentos. Tal função é realizada por meio da formação de uma película, que permite o bom funcionamento dos equipamentos, resultando em eficiência na transferência de energia, economia de energia e de combustível. Além disso, os lubrificantes protegem as máquinas contra a corrosão das partes metálicas por ação tensoativa; remove o calor gerado pelo atrito ou pela combustão, no caso de motores; promove a selagem do sistema lubrificado; e proporciona a limpeza do sistema removendo as impurezas (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; DO BRASIL et al., 2012).

3.1.1 Mercado de lubrificantes

Atualmente, as bases de maior consumo no mercado brasileiro de lubrificantes são derivados do refino do petróleo. Entretanto, não há previsão para expansão e criação de novas unidades de refino. Sendo assim, as oportunidades vigentes se concentram nos óleos sintéticos e na ampliação das operações de rerrefino. A classificação destes óleos quanto aos seus grupos poderá ser vista no tópico 3.2.1 (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014a, 2014b; ROCCO et al., 2016; SOARES, 2013a).

O mercado mundial de lubrificantes acabados constitui menos de 1% da entrada de óleo cru nas refinarias, o que significa cerca de 36.000.000 toneladas por ano, com os biolubrificantes representando aproximadamente 2% deste (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; BARTZ, 1998). O relatório Bain & Company and Gas Energy (2014) menciona que em 2012, o consumo de biolubrificantes no Brasil foi de 1.400 toneladas o que representa 0,1% do volume total de lubrificantes consumidos no mercado local, enquanto a parcela dos biolubrificantes no mercado global já era de 1%. A previsão é de que o mercado mundial de lubrificantes alcance 49.300.000 toneladas, sendo seu crescimento de 2012 a 2022 de 2,8 % ao ano (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014a, 2014b). Enquanto o mercado de lubrificantes acabados de base mineral se encontra praticamente estagnado, os biolubrificantes vêm apresentando um crescimento médio de 10% ao ano nos últimos 10 anos alertando para a importância de mais aporte de recursos no desenvolvimento e consolidação desta tecnologia (EHRAN et al., 2008; SOARES, 2013a).

Apesar do mercado de biolubrificantes no Brasil ainda ser reduzido, as informações que temos disponíveis na literatura conduz a um futuro promissor, além disso, a representatividade dos biolubrificantes a nível mundial indica que há um grande potencial de crescimento do mercado interno brasileiro.

O consumo anual de biolubrificantes no mercado europeu, por exemplo, alcançou 130.000 toneladas em 2006, 150.000 em 2008 e a tendência é de atingir 230.000 toneladas em 2020 sendo os principais usuários desta tecnologia a Alemanha e os países da Escandinávia. Nestes países mais avançados na produção de biolubrificantes, o maior obstáculo para o desenvolvimento das tecnologias verdes é a disponibilidade de matérias-primas, diferentemente do cenário brasileiro no qual temos a vantagem competitiva de produzir as matérias-primas - principalmente plantas oleaginosas - fato que coloca o país em posição privilegiada para apresentar um papel de destaque no mercado global (WHITBY, 2006; BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; PETRAN et al., 2008; SOARES, 2013a).

Os maiores obstáculos encontrados no Brasil são as incertezas técnicas uma vez que ainda se encontram no início de desenvolvimento, o que leva a problemática econômica devido aos altos custos dos produtos, mas, mesmo assim, algumas empresas estão se estabelecendo no país apostando nesse potencial e planejam altos valores de investimento para os próximos anos visando aumentar a produção de biolubrificantes. Como exemplos, se

destacam a empresa nacional paulista VGBio e as empresas norte-americanas sediadas em São Paulo: Amyris, Elevance e Solazyme (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b).

Outros fatores indicam que a expectativa será o aumento da produção de biolubrificantes no Brasil. O mercado automotivo, por exemplo, avançou de forma expressiva nos últimos anos. Este avanço é estimado diretamente pelo número de automóveis em circulação no país que cresceu de 30 milhões, no início de 2008, para 42,6 milhões, no final de 2012. Além deste fator, a produção industrial brasileira possui previsão de crescimento médio anual de 3,6% até 2025. Ambos fatores tendem a impulsionar o consumo brasileiro de lubrificantes estimulando a demanda local pelos mesmos. É importante ressaltar, no entanto, que estes lubrificantes locais possuem qualidade inferior, tanto no ramo industrial quanto no ramo automotivo e o desenvolvimento de motores mais modernos, com maior eficiência, tende a reduzir o consumo dos lubrificantes locais, uma vez que serão necessários lubrificantes de qualidade superior (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b).

No setor automotivo, os veículos que circulam no Brasil possuem tecnologias inferiores em comparação àqueles dos países desenvolvidos, sendo uma possível explicação para a utilização de lubrificantes inferiores neste segmento no Brasil. Entretanto, se acredita que isto seja temporário, uma vez que programas como o Inovar-Auto incentiva a inovação tecnológica e adensamento da cadeia produtiva de veículos automotores estão impulsionando o progresso nesta área. Este programa tem dentro de suas metas, investimentos em inovação e melhoria das qualidades dos veículos circulando no território nacional. Além disso, existem também novas regulações sobre emissões de poluentes veiculares, que podem aumentar a demanda por lubrificantes de melhor qualidade. Esperase, portanto, uma redução no consumo nacional de óleos básicos provenientes do refino, que são óleos de menor qualidade, como os parafínicos e maiores investimentos em lubrificantes sinteticos (ABDI; MDIC, 2018; BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b).

Outro exemplo de inserção de óleos provenientes de fontes renováveis são os óleos de transformadores - que servem como isolantes e que tem resistência a altas temperaturas. Nos países desenvolvidos tal qual os Estados Unidos cerca de 20% dos óleos utilizados em transformadores foram óleos vegetais enquanto no Brasil, que é o grande produtor de

oleaginosas, os óleos vegetais correspondem a apenas 3% do total de óleo utilizado em transformadores num senso realizado em 2012. Esta tendência de aumento decorre principalmente do alto custo de remediação de áreas onde ocorre vazamento de óleo mineral dos transformadores levando a maior utilização de óleos vegetais (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b).

Além do aumento no rigor das leis ambientais, visando à saúde do meio ambiente, o mesmo tipo de exigência tem sido feito na área de saúde humana tendo impacto direto sobre a demanda de lubrificantes mundialmente. Um destaque vai para a utilização de lubrificantes de grau alimentício (lubrificantes classificados como de grau alimentício não podem possuir substâncias tóxicas aos seres humanos). Esta restrição é importante principalmente no ramo das indústrias alimentícias para que os alimentos estejam protegidos no caso de contato durante o processo produtivo (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; SOARES, 2013a).

A tendência brasileira para os próximos anos consistirá, então, no avanço da produção de ésteres orgânicos, produzidos por rota renovável (biolubrificantes), de forma a tirar vantagem do benefício competitivo que o Brasil tem, no que diz respeito à produção de matérias-primas vegetais. Ademais, deverão ocorrer melhorias na eficiência do rerrefino, que consiste na reutilização dos óleos lubrificantes usados ou contaminados (OLUC), com tecnologias mais avançadas de aproveitamento dos OLUCs, além de investimentos em pólos óleoquímicos para fornecimento de matérias-primas para esta indústria (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014a).

3.1.2 Lubrificantes acabados

Os óleos lubrificantes acabados são, segundo a ANP, óleos lubrificantes formulados a partir de um óleo básico ou da mistura dos óleos básicos podendo conter ou não aditivos em sua formulação, sendo seu principal constituinte o óleo básico.

Na Figura 1 podemos observar um fluxograma demonstrando a cadeia de produção dos lubrificantes acabados até seu consumo. Os óleos lubrificantes são constituídos por

óleos básicos, que compreende a maior parte do produto final acabado. Este lubrificante normalmente contêm aditivos que são utilizados para enquadrar o lubrificante dentro de determinada especificação físico-química exigida pelo tipo de aplicação (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; DO BRASIL et al., 2012; MMA; CONAMA, 2005; ROCCO et al., 2016).



Figura 1 Fluxograma da cadeia de produção de lubrificantes (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b)

Os lubrificantes acabados derivados de óleos minerais ou sintéticos, provenientes de petróleo, são os mais utilizados atualmente. Eles são formados por hidrocarbonetos e contêm em sua composição elementos como o enxofre, nitrogênio e alguns metais traços que contribuem para sua toxicidade e baixa biodegradabilidade (ADHVARYU, A., LIU, Z., ERHAN, S.Z., 2005). Além disso, é comum, conforme o uso, surgirem problemas associados à degradação do produto e também, no caso de automóveis, à sua contaminação por subprodutos gerados pela combustão no cárter, o que leva à formação de depósitos, ao aumento de viscosidade e ao seu mau funcionamento (ARAÚJO, 2003).

Para minimizar os inconvenientes provenientes da utilização dos produtos, os óleos lubrificantes são obtidos por meio da mistura de óleos básicos e aditivos com funções antioxidantes, antidesgaste, detergente/dispersante, dentre outras. Deste modo, projetar um lubrificante acabado para executar estas funções é uma tarefa complexa, envolvendo uma avaliação cuidadosa das propriedades do óleo básico e dos aditivos que serão empregados (SILVA, 2012).

Este lubrificante será então utilizado e descartado, podendo ser rerrefinado e retornar a cadeia produtiva. Os óleos básicos, que podem ser de vários tipos de acordo com sua precedência e formas de obtenção, possuem características diferenciadas, e por isso serão abordados na seção 3.2.

3.2 Óleos básicos

O principal constituinte dos óleos lubrificantes acabados são os óleos conhecidos como bases. Estes óleos chegam a compor pelo menos 75% da mistura e podem ser derivados de petróleo, substâncias sintéticas geradas por reações químicas, óleos usados provenientes do rerrefino ou óleos de fonte renovável como a gordura animal e vegetal, aplicados separadamente ou misturados. A maior parte dos óleos básicos não atende, integralmente, todos os requisitos de lubrificação. Nestes casos, são adicionados na formulação aditivos que compõem o produto final, o lubrificante acabado (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; DO BRASIL et al., 2012; ROCCO et al., 2016).

As características e a qualidade do lubrificante acabado estão diretamente relacionadas ao óleo básico que é seu principal constituinte. Sendo assim, a escolha de qual óleo básico empregar para formular um lubrificante acabado dependerá das características físico-químicas almejadas para determinada aplicação e desempenhodo produto final. Dentre os parâmetros a serem avaliados, encontram-se a viscosidade, o índice de viscosidade, o ponto de fluidez e a estabilidade à oxidação que serão explicados nos itens 3.11.1 e 0.

3.2.1 Classificação dos óleos básicos

Os óleos básicos podem ser obtidos de diversos tipos de fontes, como o petróleo, que varia de acordo com o seu local de proveniência e o tipo de matéria prima que o formou e, além disso, existem diferentes rotas de obtenção dos óleos básicos, sendo as principais utilizadas hoje em dia o hidrorrefino: como o hidrotratamento (HDT) e hidrocraqueamento (HCC), extração por solventes e rota sintética (DO BRASIL et al., 2012; ROCCO et al., 2016; SILVA, 2012).

Com o objetivo de tornar mais didático o entendimento e de cruzar as informações de formas de obtenção/ fontes/ características principais, o órgão estadunidense *American Petroleum Institute* (API) e o europeu *Association Technique de L'industrie Europeannedes*

Lubrifiants (ATIEL) adotaram um sistema de classificação único ATIEL/API, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 Classificação ATIEL/API dos tipos de óleos básicos (ROCCO et al., 2016; LUBRIZOL, 2002)

	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V
	¹ Saturados <	Saturados ≥	Saturados ≥		Os demais
	90%	90%	90%		Ex.:
ntes	² Enxofre >	Enxofre ≤	Enxofre ≤	_	naftênicos,
Componentes	0,03%	0,03%	0,03%	Polialfaolefinas	silicones,
ошр				(PAOs)	ésteres
O	80 ≤ ³ IV < 120	00 < 11/2 < 420	IV.> 120		obtidos por
	80 ≤ IV < 120	80 ≤ IV < 120	IV ≥ 120		rota
					sintética.

¹ Conforme método ASTM D 2007

Como se pode notar, os óleos básicos são então classificados em grupos, de acordo com o teor de enxofre da amostra, o índice de viscosidade e o teor de saturados junto aos processos de obtenção e as fontes das quais se originam (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; ROCCO et al., 2016; SILVA, 2012 e SOARES, 2013). A seguir são detalhados os principais grupos de óleos básicos:

• Grupo I: são os óleos minerais parafínicos obtidos por destilação fracionada seguida de extração por solvente (extração de aromáticos e desparafinação por solvente, passando ou não pelo hidroacabamento) cuja utilização principal é em óleos automotivos (hidráulico, motor ou engrenagens);

² Conforme métodos ASTM D 2622 ou ASTM D 4294 ou ASTM D 4927 ou ASTM D 3120

³ Índice de viscosidade (IV) ASTM D 2270

- Grupo II: são obtidos por destilação fracionada seguida de hidrorrefino e são muito empregados como óleo de motor. Possuem bom desempenho quanto à estabilidade oxidativa e ponto de fulgor, mas não atingem os requisitos no que se refere a ponto de fluidez e viscosidade a baixa temperatura. São produzidos principalmente na América do Norte, onde dominam 45% do mercado de lubrificantes, e na Ásia.
- Grupo III: são óleos básicos do tipo II submetidos ao processo adicional de hidrocraqueamento, que é um tratamento com hidrogênio seguido de isomerização, com o objetivo de proporcionar bons desempenhos em diversas propriedades, como o índice de viscosidade, mesmo sem terem modificações químicas especiais. Sua produção é principalmente realizada na Europa e na Ásia e eles são utilizados para fabricação de óleos lubrificantes sintéticos.
- Grupo IV: são óleos básicos, obtidos por reações químicas, conhecidos como polialfaolefinas (PAOs), que são os óleos sintéticos, derivados da nafta do petróleo, mais utilizados como óleos básicos ou aditivos de lubrificantes acabados. São compostos de moléculas de dímeros a tetrâmeros e se assemelham bastante aos óleos básicos minerais devido à ausência de ligações duplas e de grupos funcionais reativos. No entanto, esta característica leva à dificuldade de mistura com aditivos devido à falta de polaridade da molécula (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012). Pelas propriedades diferenciadas e por ser um óleo sintético, as PAOs são classificadas em um único grupo. Os produtos provenientes das PAOs possuem uma composição química estável e cadeias moleculares uniformes, o que conduz a um excelente desempenho como lubrificante, por exemplo, para uso em motores de alto desempenho.
- Grupo V: neste grupo estão os óleos naftênicos e também os ésteres sintéticos. Ele foi instituído para inserir os óleos básicos que não se enquadram nos demais grupos como os poli-isobutenos (PIBs) e os poliolésteres (POEs) que são base para alguns lubrificantes acabados com diversas aplicações como em engrenagens e compressores.

Algumas refinarias produzem os óleos básicos dos grupos I, II e III com índice de viscosidade mais elevado, ainda dentro de suas respectivas faixas (IV próximo a 120 para os

Grupos I e II, conforme Tabela 1, mas para se diferenciarem recebem a denominação pelo mercado de grupos I+, II+, III+ (ROCCO et al., 2016).

SOARES (2013), considera também a existência de um grupo VI que abrangeria um tipo específico de oligômero de olefinas (poli-internaolefinas - PIOs), que é fabricado na Europa pela polimerização de um átomo interno da cadeia alifática de carbonos, onde está a instauração, e não no carbono primário (alfa) que origina as PAOs.

3.2.1.1 Óleos básicos minerais

Os óleos minerais são obtidos pelo refino do petróleo, por meio da destilação a vácuo do óleo cru ou de óleos desasfaltados. Na composição do petróleo ainda existem frações de hidrocarbonetos aromáticos que não são adequadas para a utilização em óleos lubrificantes e são extraídas no processo de refino para modificar as características do óleo, sendo possível, por exemplo, melhorar a resistência à oxidação do lubrificante, aumentar o índice de viscosidade e torná-lo mais claro. Estes óleos contêm menores proporções de hidrocarbonetos aromáticos e são classificados como parafínicos e naftênicos (Tabela 2) de acordo com sua maior constituição de hidrocarbonetos provenientes do tipo de petróleo processado e das rotas de refino empregadas (DO BRASIL et al., 2012; SOARES, 2013a).

Tabela 2 Comparação entre as características dos óleos parafínicos e naftênicos (adaptado de ROCCO et al., 2016; DO BRASIL et al., 2012 e SILVA, 2012)

Características	Parafínico	Naftênico		
Índice de	Alto	Baixo		
Viscosidade (IV)				
Ponto de	Alto	Baixo		
Fluidez				
Estabilidade	Воа	Média		
oxidativa				
Carbono	20	40		
naftênico (%)				
Exemplo de estrutura molecular				

Os óleos minerais parafínicos são compostos principalmente por parafinas, que são alcanos de cadeia longa e com ramificações (Tabela 2). Estes óleos são utilizados na maior parte dos lubrificantes automotivos e industriais, a saber: sistemas hidráulicos, compressores, motores, mancais, engrenagens e transmissões, e por isso constituem cerca de 90% da produção mundial de óleos básicos. No entanto, a produção destes óleos parafínicos torna essencial uma etapa de desparafinação e, mesmo assim, ainda é necessário o emprego de aditivos para diminuir o ponto de fluidez e evitar não somente a formação de cristais parafínicos quando submetido a baixas temperaturas, mas também reduzir a temperatura de escoamento do produto (DO BRASIL et al., 2012; ROCCO et al., 2016; SILVA, 2012).

Já os óleos básicos minerais naftênicos, que são originados de petróleos ditos como naftênicos, estão classificados no grupo V devido, entre outros fatores, ao seu baixo IV (entre 0 e 40); estes óleos quase não possuem parafinas em sua constituição, sendo formados principalmente por cicloalcanos (Tabela 2). Seus baixos pontos de fluidez são indicados para aplicações que demandam baixas temperaturas, como óleos de refrigeração e seu baixo índice de viscosidade os torna mais suscetível a aplicações como óleos para trabalhar com metais (ferramentas de corte e laminação), óleos de processamento de

borracha (extensores), óleos isolantes de componentes elétricos (transformadores), fluidos de amortecedores e na formulação de graxas (DO BRASIL et al., 2012; ROCCO et al., 2016; SILVA, 2012).

Os lubrificantes derivados de óleos básicos minerais possuem características diferentes de acordo com o local de extração do óleo cru, principalmente no que se refere à viscosidade. Além disso, muitos óleos minerais contêm em sua composição, compostos de baixa massa molar que volatilizam, durante a sua utilização, gerando aumento da viscosidade e diminuindo o ponto de fulgor dos óleos minerais em comparação a óleos vegetais com a mesma viscosidade (ERHAN, 2005).

3.2.1.2 Óleos básicos de rerrefino

O uso de qualquer óleo lubrificante acabado gera, segundo a NBR-10004 (ABNT), um resíduo tóxico que são os óleos lubrificantes usados ou contaminados (OLUC) que contêm, dentre outros, compostos potencialmente carcinogênicos, como aromáticos polinucleados, provenientes da deteriorização parcial do óleo lubrificante acabado (MMA; CONAMA, 2005). Por sua vez, o descarte dos OLUCs realizado diretamente em cursos d'água ou no solo gera graves danos ambientais.

Assim, a resolução CONAMA 362 de 2005 é o documento que estabelece as diretrizes de recolhimento e destinação dos OLUCs como se pode ver pelo Art. 1° citado abaixo:

"Art. 1º Todo óleo lubrificante usado ou contaminado deverá ser recolhido, coletado e ter destinação final, de modo que não afete negativamente o meio ambiente e propicie a máxima recuperação dos constituintes nele contidos, na forma prevista nesta Resolução."

MMA & CONAMA, Resolução 362/2005

Desta forma, o rerrefino é um método ambientalmente mais seguro para se realizar a reciclagem dos OLUCs, sendo a melhor alternativa em curto prazo deste tipo de resíduo (MMA; CONAMA, 2005). Esta técnica compreende a reutilização dos OLUCs por meio da

remoção de aditivos, produtos de degradação e de contaminantes dos óleos lubrificantes usados ou contaminados, para se obter óleos básicos com diversas qualidades que podem variar de acordo com o processo utilizado bem como a eficiência do processo (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b; MMA; CONAMA, 2005).

No Brasil, os processos de rerrefino apresentam ao menos 5 etapas que exigem destilação à vácuo com temperaturas superiores a 250 °C, além do uso de catalisadores e solventes para a extração que não são compatíveis com o meio ambiente: (a) homogeneização, caracterização e segregação das amostras de OLUC; (b) desidratação e obtenção de hidrocarbonetos leves; (c) tratamento químico ou extração; (d) recuperação dos solventes/catalisadores e (v) clarificação (CANCHUMANI, 2013). O processo de rerrefino, no entanto, gera uma borra ácida, devido ao processo de clarificação que utiliza ácido sulfúrico até 20% (m/m), que é extremamente tóxica ao meio ambiente (ABNT, 2004) e de difícil degradação (GETLIFF; JAMES, 1996). Uma tentativa de neutralizar a formação desta borra ácida, produzida no processo convencional, é a utilização do processo Meiken melhorado (ou ácido/argila), que é a principal tecnologia utilizada no Brasil. Esta tecnologia apresenta menores gastos e custo de manutenção, entretanto, a eficiência é menor e os produtos têm qualidades inferiores (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b). Por outro lado, esta tecnologia gera outro resíduo denominado borra neutra que também entra na categoria de produtos perigosos ao meio ambiente, segundo a NBR 10004 (ABNT, 2004).

Existem no Brasil 19 rerrefinadores em operação. O líder do segmento é a Lwart, que detém cerca de 50% do mercado de rerrefino em território nacional (2012), de acordo com pesquisa realizada pela Agência Virtual. O restante do mercado está dividido entre as pequenas empresas. A atuação no mercado de rerrefino depende de uma operação eficiente de logística reversa de coleta dos OLUCs que garanta o fornecimento da matéria-prima do rerrefino a custos competitivos (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b).

Apesar de a resolução CONAMA 362/2005 deixar claro que todo OLUC coletado deverá ser destinado à reciclagem pelo rerrefino, atualmente a reutilização dos OLUCs chega apenas a 19% da demanda por óleos básicos para lubrificantes (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b). Um dos fatores que impede o crescimento deste mercado é a falta de diversidade no material gerado e a falta de fiscalização dos órgãos públicos quanto ao

descarte irregular dos OLUCs diminuindo, portanto, o potencial de fornecimento de matériaprima para o rerrefino (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014a e b).

3.2.1.3 Óleos básicos sintéticos

Os óleos minerais ainda são a maior fonte de óleos básicos, entretanto, com o rigor das leis ambientais e a diminuição das reservas de petróleo, a demanda por óleos com qualidades específicas vem aumentando. Assim, o uso de produtos com propriedades lubrificantes melhoradas, provenientes de síntese química a partir de derivados de petróleo, como o caso das PAOs, é cada vez maior (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; SILVA, 2012; SYAIMA et al., 2015).

Apesar do aumento de interesse nestes tipos de óleos ser recente, a produção de óleos sintéticos começou antes mesmo da existência do motor de combustão interna. O primeiro lubrificante sintético foi desenvolvido por Friedel e Crafts, em 1877, pelas reações de alquilações e acilações de anéis aromáticos empregando como catalisador o tricloreto de alumínio nas conhecidas como *Friedel-Craft reactions* (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012; RUEPING; NACHTSHEIM, 2010);

Durante a Segunda Guerra Mundial, a necessidade de lubrificantes resistentes a diferentes variações de temperatura (altos IVs) em motores nos segmentos militares levou ao desenvolvimento, nos Estados Unidos, da tecnologia de produção de lubrificantes sintéticos pelo *the United States Naval Research Laboratory*, que foram usados específicamente nos equipamentos militares e industriais. Antes que os ésteres sintéticos fossem desenvolvidos, o óleo de mamona e de colza eram utilizados. No entanto, mesmo que com custos elevados, vários ésteres sintéticos desenvolvidos nesta época foram utilizados como lubrificantes industriais por muitos anos (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012; VANDER; KENBEEK, 1993).

O primeiro lubrificante 100% sintético foi produzido pela AMSOIL e aprovado por todos os testes do *American Petroleum Institute* (API) atingindo sua qualificação API em 1972, sendo comercializado somente em 1975. Apesar de sua aceitação ser prejudicada

pelos preços elevados, suas características elevam o interesse por estes óleos quando comparados às bases minerais. Dentre elas, destacam-se: durabilidade, melhores propriedades a baixas temperaturas (pontos de fluidez), maiores estabilidades termo-oxidativa, elevados índices de viscosidade e altos pontos de fulgor (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012; SOARES, 2013a).

Desde então, a maior parte das grandes empresas já produzem alternativas de óleos sintéticos e semi-sintéticos para comercialização. Cerca de 80% do mercado mundial de lubrificantes sintéticos é composto por: polialfaolefinas (45%), ésteres orgânicos (25%) e poliglicóis (10%) (MURPHY et al, 2002). Dentre as bases sintéticas empregadas, a de maior uso é a PAO.

Em contrapartida, as bases minerais apresentam menor custo e são mais abundantes comparativamente aos sintéticos (ROCCO et al., 2016; SILVA, 2012). Então, surge a questão de como convencer os usuários industriais a pagar mais por um produto sintético. Os lubrificantes derivados do petróleo são mais baratos, desta forma, os sintéticos não podem competir pelas mesmas aplicações. Em geral, apesar das características difundidas no meio industrial, que os lubrificantes sintéticos são melhores protetores e têm maior durabilidade.

Deste modo, apesar dos lubrificantes convencionais apresentarem maior utilização industrial, a decadência das fontes finitas de petróleo, as novas especificações de qualidade de lubrificantes acabados e o atendimento aos rigorosos regulamentos ambientais do futuro são a principal força motriz para os novos desenvolvimentos tecnológicos nesta área de sintéticos (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012).

3.2.1.4 Óleos básicos de fontes renováveis

A maior parte dos óleos lubrificantes tem base em óleos minerais que são potenciais poluidores em vários níveis, a saber: a sua combustão gera gases residuais nocivos ao meio ambiente e à saúde pública; tem baixa biodegradabilidade; alta toxicidade e, mesmo assim, cerca de 50% de todos os lubrificantes vendidos terminam no ambiente, seja por perdas durante a aplicação, derramamentos ou mesmo volatilização. No caso dos óleos 100%

sintéticos, seu uso ainda é restrito devido aos altos custos e pela problemática ambiental tanto devido a sua composição (produzidos a partir de óleos minerais) quanto pelo seu processo produtivo ser constituído por uma série de catálises químicas (MADANHIRE; MBOHWA, 2016; MMA; CONAMA, 2005; TAMADA et al., 2012).

Nos últimos anos a diminuição das reservas de petróleo aliadas ao aumento dos preços do óleo cru e à preocupação com emissões desreguladas de compostos tóxicos para o meio ambiente conduziu a produção de leis rigorosas quanto ao uso de lubrificantes, principalmente quando se trata de áreas mais "ecologicamente sensíveis", e que tendem a expandir sua atuação até mesmo na formulação de lubrificantes e adição de aditivos.

No entanto, para os biolubrificantes atuarem em substituição aos lubrificantes de base mineral, algumas desvantagens inerentes a sua natureza deverão ser corrigidas (KANIA et al., 2015). Por exemplo, estes produtos apresentam altos pontos de fluidez o que significa que eles têm pouca aplicação em baixas temperaturas, e baixa estabilidade oxidativa, o que indica maior sensibilidade à hidrólise, que é um fator diretamente relacionado à biodegradabilidade da molécula (KANIA et al., 2015; SILVA, 2012).

Porém, para que se diminua o potencial oxidante de uma molécula, é necessário que todos os pontos passíveis de sofrer oxidação sejam protegidos ou eliminados, no entanto, ao se produzir uma molécula com estes parâmetros, se deve cogitar que da mesma forma que ela está protegida da oxidação ela também estará protegida contra a ação dos microorganismos responsáveis pela sua biodegradação (SILVA, 2012). Assim, o grande desafio da produção de um biolubrificante está em encontrar um equilíbrio, de forma que uma molécula seja capaz de ter alta resistência à oxidação e também seja passível de ser consumida por micro-organismos.

Pelos motivos apresentados nesta seção, nos últimos anos, o uso de óleos básicos do grupo I está sendo reduzido, à medida que aumenta a necessidade do desenvolvimento de lubrificantes de qualidade superior aos vigentes. Além disso, a escolha de biolubrificantes contribui para a imagem pública da companhia (ISO 14000) e com isto abre a possibilidade da conquista de novos mercados (MADANHIRE; MBOHWA, 2016; ROIZ, 2011; SOARES, 2013b). Desta forma, a tendência é dos óleos básicos dos grupos IV e V continuarem a crescer em uso, ampliando seu desenvolvimento e conquista de mercado para se atingir

especificações mais exigentes no quesito extensão do intervalo de troca do lubrificante e durabilidade do equipamento (ROCCO et al., 2016).

Assim, a demanda de produtos verdes derivados de fontes renováveis como óleos vegetais e gorduras animais, tanto para uso automotivo quanto no maquinário industrial, aumentou e conduzirá, futuramente, a alterações na procura por aditivos verdes para os lubrificantes acabados (AZIZ et al., 2016; GARCÍA-ZAPATEIRO; VALENCIA; FRANCO, 2014; MADANHIRE; MBOHWA, 2016; MCNUTT; HE, 2016; MOULONGUI; PELET, 2001; PANCHAL et al., 2017).

3.3 Óleos vegetais

Enquanto algumas plantas produzem sementes ricas em amido, que são carboidratos, para fornecer a energia necessária para a germinação do vegetal, outras armazenam triacilgliceróis, que são hidrolisados via oxidação dos ácidos graxos derivados do óleo produzindo a energia necessária para o desenvolvimento embrionário da plântula (MCKEON et al., 2016).

Os óleos vegetais são encontrados em frutas ou sementes de plantas oleaginosas e comumente são utilizadas para fins alimentícios. Estes óleos são compostos principalmente por moléculas de triacilglicerol que consistem na esterificação de um álcool poli-hidroxilado que dá a estrutura à molécula, o glicerol, que contém 3 grupamentos hidroxila e três ácidos graxos que podem ser saturados e/ou insaturados, sendo estes últimos mais comuns. Da mesma forma, quando um ou dois grupos hidroxila são esterificados no glicerol, serão formados, respectivamente monoacilgliceróis e diacilgliceróis (RUDNICK, 2006). De uma maneira geral, óleos vegetais são constituídos principalmente por triacilgliceróis, mas também têm a presença de traços de diacilgliceróis, ácidos graxos livres e diversos compostos orgânicos como os esteróis e antioxidantes, o que, dependendo da sua utilização, exigirá etapas de purificação.

A composição de triacilgliceróis varia de acordo com o óleo e, normalmente, a porção acil é composta de cinco principais ácidos graxos com proporções variadas: o ácido palmítico

(16:0) e o esteárico (18:0), como exemplo de ácidos graxos saturados; o ácido oléico (18:1 Δ 9), como exemplo de ácido monoinsaturado; e, os ácidos linoléico (18:2 Δ 9,12) e α -linolênico (18:3 Δ 9,12,15), como exemplos de ácidos poli-insaturados. Apesar de muito utilizados no ramo alimentício, os óleos vegetais, bem como seus hidrolisados e seus ésteres derivados têm sido amplamente utilizados em aplicações como: sabões, cosméticos, combustíveis e lubrificantes, dentre outras (MCKEON et al., 2016; ROCCO et al., 2016).

Muitos dos óleos utilizados na literatura disputam mercado com a sua utilização na alimentação, como os óleos de palma (Elaeis guineenses), soja (Glycine max), canola (Brassica napus), girassol (Helianthus annuus), oliva (Olea europaea), milho (Zea mays) e amendoim (Arachis hypogaea). No entanto, existem outros óleos que não apresentam valor nutritivo como os óleos provenientes de plantas da família Euphorbiaceae como o óleo de mamona (Ricinus communis L.), cuja composição de ácido graxos é de 90% de ácido ricinoléico (12-OH 18:1Δ9), o óleo de tungue (Aleurites fordii) que é composto por 80% de ácido eleosteárico (18:3Δ9cis,11trans,13trans) e o óleo de Lesquerella fendleri que é composto por 8 ácidos graxos, dentre eles de 55-60% do ácido lesquerólico (14-OH 20:1Δ11cis) e de 2-4% do ácido auricólico que aparentemente não possui a composição bem conhecida variando entre dois extremos: a presença de duas hidroxilas e duas ligações duplas, e a presença de uma hidroxila e uma ligação dupla. No entanto, na major parte dos artigos científicos ele é caracterizado com uma hidroxila e duas insaturações (ácido 14hidroxi-11,17-eicosadienóico) (BRAHIM et al., 1996; CARLSON; CHAUDHRY; BAGBY, 1990; PELAEZ et al., 2003). A presença natural de um hidroxila no meio da cadeia carbônica conduz a uma estrutura molecular diferenciada tornando-os únicos e de aplicabilidade na área industrial (MCKEON et al., 2016; ROCCO et al., 2016; SOARES, 2013b).

3.3.1 Aplicação na produção de lubrificantes

Apesar de os óleos vegetais não terem bom desempenho em baixas temperaturas e serem instáveis quanto à aplicação em temperaturas elevadas e a potenciais agentes oxidantes, o interesse sobre eles e seus derivados vêm aumentando na produção de óleos básicos e aditivos para a produção de biolubrificantes. Sendo assim, para biolubrificantes

provenientes dos óleos vegetais e de uma forma geral, as estabilidades oxidativa e térmica são parâmetros de extrema importância. Óleos que possam resistir à oxidação são menos propensos à formação de depósitos, material escuro e coprodutos corrosivos, além de serem menos susceptíveis a variações de viscosidade, conforme a mudança de temperatura, isto é, apresentam um alto índice de viscosidade (AGUIEIRAS et al., 2011).

Na Tabela 3 temos a representação aproximada da composição de ácidos graxos de alguns dos óleos mais utilizados para a produção de lubrificantes.

Tabela 3 Composição percentual (%) dos ácidos graxos mais comuns encontrados nos óleos vegetais mais utilizados para a produção de lubrificantes (ROCCO et al., 2016)

Ácido Graxo	Óleos vegetais				
	Oliva	Girassol	Soja	Algodão	Milho
Miristico (14:0)	-	0,08	0,2	0,8	-
Palmítico (16:0)	14,23	8,36	11,35	20,13	14,03
Esteárico (18:0)	3,42	5,03	4,15	3,10	3,33
Oléico (18:1)	71,10	27,65	25,30	22,86	35,08
Linoléico (18:2)	6,76	56,30	50,60	50,16	44,40
Linolênico (18:3)	1,36	2,06	8,20	1,32	1,96

O óleo de soja é a fonte de matéria prima mais atrativa em todo o continente americano e ocupa a primeira colocação na produção mundial de óleos vegetais (29%) representando uma importante fonte renovável. Nos Estados Unidos, a sua produção é de 2,5 bilhões de galões por ano, enquanto a produção mundial é de cerca de 6 bilhões de galões por ano. Esta elevada produção ocorre devido à combinação do baixo custo com a estabilidade mesmo com a elevada quantidade de insaturações nos ácidos graxos que compõem este óleo (Tabela 3). O óleo de soja cru tem viscosidade a 40 °C próxima à de um óleo mineral (29,00 cSt — unidade de viscosidade centistokes que equivale à mm²/s nas condições descritas em 4.2.2.3), um alto ponto de fulgor (325 °C) - que é relacionado a baixa volatilidade, o que reduz ou mesmo elimina os potenciais perigos durante o uso - e um alto

índice de viscosidade (246). Todos os óleos vegetais crus contêm alguns elementos naturais que podem interferir: na estabilidade do óleo, na solubilidade em hidrocarbonetos, nas reações químicas e no ponto de fluidez. Dessa forma, é necessária uma etapa de purificação para a obtenção de óleos vegetais refinados. Entretanto, para modificar a cadeia do ácido graxo do óleo vegetal, é necessário conhecer com exatidão sua composição, além de suas estabilidades térmica e oxidativa (DA SILVA; FREIRE, 2017; MCKEON et al., 2016; PETROVIC, 2008; NAGENDRAMMA; KAUL, 2012).

Outra fonte vegetal extremamente atrativa e que vem cada vez mais conquistando seu espaço é o óleo de mamona, que não entra na classificação descrita na Tabela 3, pois se distingue dos demais pela presença de 90% de um hidroxiácido, o ácido ricinoléico, fato que o transforma numa fonte praticamente pura deste substrato.

Este ácido graxo (12-OH 18:1Δ9) é responsável por diversas propriedades desejáveis na produção industrial em diversas áreas, dentre elas a produção de lubrificantes conforme será visto no tópico 3.5. Os principais fornecedores deste óleo são a Índia, o Brasil e a China, no entanto, seu cultivo representa alguns desafios devido à presença da ricina uma proteína alérgena que inibe a síntese proteica por inativação ribossomial e por isso é extremamente tóxica. Além da ricina existe também nas sementes e tortas de mamona a presença de um complexo também alérgeno formado de glicoproteínas e proteínas de baixo peso molecular conhecido como CB-1A dentro do qual destaca-se a albumina 2S. A literatura científica e de patentes já descreveram métodos que possibilitaram a total detoxificação da torta da mamona por meio da fermentação em estado sólido a partir de fungos filamentosos. Esta metodologia possibilitou a geração de enzimas como as lipases e o uso desta torta para ração animal (CASTRO et al., 2009; FERNANDES et al., 2012; GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F.M.; FELIX, S.P.; BEVILAQUA, J.V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, 2009; GODOY et al., 2011, 2012).

Por outro lado, o óleo de mamona não apresenta toxinas em sua constituição, uma vez que estas permanecem na torta proveniente das prensagens das sementes para a sua extração (MCKEON et al., 2016).

Na Tabela 3 pode-se notar que a maior porção de ácidos graxos que compõem os óleos vegetais contém insaturações do tipo *cis*, o que contribui diretamente para o estado

líquido dos óleos vegetais e, consequentemente, na diminuição do ponto de fusão – por exemplo, o ácido esteárico (18:0) tem ponto de fusão 69,6 °C enquanto o ácido oléico (18:1) que contém uma ligação dupla, *cis*, do carbono 9 para o 10, tem ponto de fusão de 13,4 °C. Isso ocorre porque a configuração *cis* das duplas ligações provoca uma dobra de 30° na cadeia carbônica, o que dificulta a agregação das moléculas, diferentemente do que ocorre com os ácidos graxos saturados, que é o oposto. Quanto maior o teor de ácidos graxos saturados lineares na composição do óleo vegetal, menos fluido ele será. Desta forma, materiais com alto teor de ácidos graxos saturados são mais propensos a serem sólidos na temperatura ambiente, como ocorre com as gorduras animais. Estas substâncias não serão bons lubrificantes, uma vez que seu desempenho em baixas temperaturas será pior do que aqueles que contenham de forma predominantes ácidos graxos insaturados (BERG; TYMOCZKO; STRYER, 2002; DA SILVA; FREIRE, 2017; RUDNICK, 2006).

Por vezes, os óleos vegetais *in natura*, ou seja, sem nenhuma modificação química, podem ser utilizados como base ou diretamente como óleos lubrificantes. No entanto, algumas das propriedades físicas, tais como a elevada viscosidade e as baixas estabilidades térmica, hidrolítica e oxidativa ainda limitam a aplicação direta dos óleos vegetais como lubrificantes (CERMAK; BRANDON; ISBELL, 2006; MOULOUNGUI; PELET, 2001). Nos próximos tópicos 3.3.2 e 3.3.3, serão detalhadas as possíveis hipóteses para a baixa estabilidade térmica e oxidativa dos óleos vegetais.

3.3.2 Insaturações na porção acil

As insaturações presentes na porção acil dos óleos vegetais, funcionam como sítios ativos para reações de oxidação uma vez que ligações do tipo π são notadamente mais fracas que as ligações do tipo σ . Em particular, as ligações duplas são consideradas como obstáculos para aplicações tecnológicas, uma vez que são especialmente reativas podendo reagir inclusive com o oxigênio do ar (WAGNER; LUTHER; MANG, 2001).

No entanto, PETROVIC (2008) salienta que ligações duplas internas em óleos vegetais não são tão reativas a ponto de serem polimerizadas diretamente. Primeiramente, isto

ocorre devido à presença de hidrogênios alílicos, que funcionam como "armadilhas" para qualquer radical. O termo "alílico" vem da unidade básica C=C-C. Os carbonos hibridizados em sp³ seguidos de um carbono sp² são chamados de carbonos alílicos, e o substituinte que estiver ligado a este carbono se chamará de substituinte alílico (TABARELLI, 2012). A posição alílica e bisalílica (alílica pelas duas extremidades) em ácidos graxos (Figura 2) são potenciais reativos para reações de oxidação (OYMAN et al., 2005).

Os óleos lubrificantes são, normalmente, submetidos a altas temperaturas, o que pode significar um entrave na utilização de óleos vegetais *in natura*, uma vez que nesta condição, as moléculas se tornam mais reativas e as duplas ligações podem migrar ao longo da cadeia. Além disso, se os óleos forem aquecidos a altas temperaturas (~330 °C), pode ocorrer a polimerização do próprio ácido, formando os chamados óleos "encorpados", que são óleos de elevada viscosidade.

Figura 2 Representação das posições alílicas (♥) e bisalílicas (♥) em óleo vegetais (PETROVIC, 2008).

3.3.3 Hidrogênio β à ligação éster

Outro fator que leva à instabilidade térmica, hidrolítica e de oxidação dos óleos vegetais é a presença de um hidrogênio β na estrutura do glicerol. MOULOUNGUI e PELLET (2001) em seu artigo explicam que a presença de um átomo de hidrogênio β à porção alcoólica do éster aumenta o risco de decomposição da molécula por meio de uma reação que envolve um mecanismo cíclico de baixa energia que leva, em última instância, a quebra

do éster em olefinas (alcenos) e ácidos carboxílicos (Figura 3). Já no caso de ésteres que não possuem em sua estrutura este átomo de hidrogênio β, para a sua quebra será necessário um mecanismo que envolve muita energia e a formação de radicais livres, sendo somente possível em altas temperaturas (Figura 4).

Figura 3 Decomposição de um éster com a presença de um hidrogênio β (circundado) por um mecanismo cíclico de baixa energia.

Figura 4 Decomposição de um éster na ausência de um hidrogênio β por um mecanismo de alta energia.

Com o objetivo de testar a hipótese de MOULOUNGUI e PELLET (2001) em moléculas derivadas do glicerol, tais quais os óleos vegetais, SILVA (2012) realizou testes comparando a estabilidade térmica da Triacetina e do Acetil-TMP, cujas estruturas estão na Figura 5, com o uso de cromatografia gasosa e de camada fina (TLC – thin-layer chromatography) para acompanhar a formação dos produtos de degradação térmica. De acordo com os resultados obtidos de decomposição térmica a 170 °C, o acetil-TMP parece ser mais termicamente estável do que a Triacetina, uma vez que a sua taxa de decomposição é um pouco mais elevada do que a do acetil-TMP, fato que corrobora com a hipótese da instabilidade do hidrogênio β de MOULOUNGUI e PELET (2001).

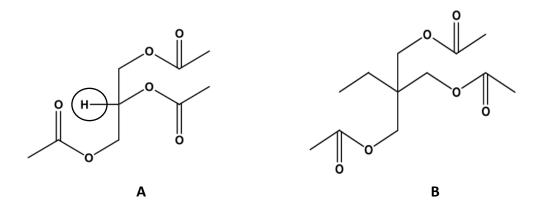


Figura 5 Molécula de Triacetina - hidrogênio β circundado (A); Molécula de Acetil-TMP (B) (adaptado de SILVA, 2012)

Assim, com o objetivo de criar alternativas a estes problemas a grande preocupação mundial está voltada para a produção de fluidos com maior durabilidade e que não se degradem, em curto prazo, sendo esta uma das principais prioridades do setor oleoquímico desde os anos 90. No início desta década a empresa Dupont Co., norte-americana, introduziu uma soja modificada geneticamente, cujo óleo, originalmente projetado para frituras, continha elevados teores (>80%) de ácido oleico (18:1), e baixíssimos teores (3%) de ácido linolênico (18:3), o que correspondeu a um aumento de 27 vezes na estabilidade oxidativa do óleo de soja original que contém 20% de ácido oléico e 8% de linolênico. Tal característica auxiliou o desenvolvimento de diversos óleos lubrificantes e graxas com elevados teores de ácido oléico. Apesar destes óleos, ricos em ácido oléico, solucionarem o problema da estabilidade oxidativa, não resolveriam a questão do ponto de fluidez, sendo necessária a mistura destes óleos com outros óleos, em geral, ésteres sintéticos, para melhorar esta propriedade que, além de serem mais caros, por vezes tinham incompatibilidade com as borrachas presentes nas juntas de vedação dos equipamentos (elastômeros) (HONARY, 2009).

Desta forma, há um movimento crescente para o desenvolvimento de óleos vegetais quimicamente modificados, que permitam a maior flexibilidade na produção de qualquer base vegetal, e que originem óleos que tenham, não somente alta estabilidade oxidativa, mas também bons desempenhos quanto às propriedades a baixas temperaturas. Neste contesto se destacam os estolídeos que vêm sendo produzidos por rota química por meio da ligação entre ácidos insaturados. Estes compostos que serão descritos no tópico 3.9, tem

apresentado excelentes propriedades físicas e químicas representando uma boa alternativa para a produção de biolubrificantes (HONARY, 2009).

3.3.4 Óleo de mamona

O óleo de mamona é proveniente da prensagem da mamona que é a semente da mamoneira (Ricinus communis L.). A mamoneira é uma planta típica da região tropical, pertencente à família das Euphorbiaceae, cujo gênero, Ricinus, é tido como monotípico, uma vez que há somente uma espécie: a Ricinus communis. Apesar de apenas uma espécie ser descrita, existem diversas subespécies reconhecidas: R. communis persicus, R. communis sinensis, R. communis africanus e R. communis zanzibarensis, sendo que todas apresentam o mesmo número de cromossomos e, portanto, são compatíveis, possibilitando que haja o intercruzamento entre as subespécies o que eleva a alogamia cuja taxa chega a mais de 40%, o que dificulta encontrar genótipo com pureza varietal. A principal forma de polinização é através do vento, o que facilita ainda mais a alogamia e a dispersão rápida pelo território nacional. É uma planta de hábito arbustivo, com colorações das suas estruturas aéreas variando entre o verde, o vermelho e o rosa. Suas inflorescências são paniculares do tipo racemo. Seus frutos geralmente possuem espinhos o que, evolutivamente, indica perigo a espécies predadoras. As sementes apresentam-se com diferentes tamanhos, formatos e, assim como as partes aéreas, com grande variabilidade de padrões de coloração (AGEITEC, 2015; AZEVEDO; LIMA, 2001; EICHOLZ; SILVA, 2011; MACEDO et al., 2006; MILANI; COUTINHO, MÁRCIA B. M. NÓBREGA SUASSUNA; COUTINHO, 2005).

Existem relatos da cultura da mamoneira no Egito desde o ano de 4000 a. C. Já nas Américas, a introdução foi feita, provavelmente, depois da chegada dos europeus, com a vinda dos escravos africanos, sendo as formas existentes na época semelhantes às da África. A mamoneira se mostrou completamente adaptável às condições brasileiras, sendo encontrada, hoje em dia, crescendo espontaneamente em todo o território nacional (AGEITEC, 2015; NETO, 2005).

A partir da prensagem das mamonas, que contém de 40-60% de óleo em sua constituição, extrai-se o óleo de mamona ou de rícino, que apesar de ser amplamente

conhecido devido ao seu poder laxante, menos de 1% é utilizado para este fim, enquanto a maior parte é utilizada tanto *in natura* quanto após processamento (ricinoquímica) em diversas aplicações industriais, tais como: produção de fármacos, cosméticos, na formulação de tintas e plastificantes, proteção anticorrosiva, biodiesel, lubrificantes, fluidos hidráulicos, polímeros, corantes, colas e aderentes, aditivos para resinas vinílicas, síntese de fungicidas, impermeabilizante de tecidos, entre outras aplicações (MCKEON et al., 2016; NETO, 2005).

Um grande investimento foi realizado em diversas regiões brasileiras com o objetivo de se incentivar o cultivo da mamona para que esta fosse fonte principal do biodiesel a ser produzido no país. Entretanto, esta estratégia não foi exitosa e, além do seu uso como matéria-prima a produção de biodiesel gerar um produto que não atinge as especificações necessárias para a sua utilização como produto industrial, a utilização deste óleo em produtos de maior valor agregado, como os biolubrificantes, poderá vir a ser uma estratégia interessante (DA SILVA; FREIRE, 2017).

3.3.5 Ácido ricinoléico

A cultura da mamoneira apresenta um importante potencial econômico e estratégico ao país e a grande varidedade de aplicações industriais do óleo de mamona somente são possíveis devido a sua composição química bastante singular que conta com a presença de 90% de ácido ricinoléico ou ácido 12-hidroxi-9-cis-octadecenóico (12-OH 18:1Δ9) (Figura 6) (MCKEON et al., 2016; SAVY FILHO et al., 2007). Além do óleo de mamona, outros óleos vegetais também possuem ácidos graxos incomuns, tais como, o óleo de tungue, que é composto por 80% de ácido eleosteárico (18:3Δ9cis,11trans,13) e o óleo de *Lesquerella fendleri* que contém cerca de 55 – 60% de ácido lesqueróico (ácido 14-hidroxi- 11- *cis*-eicosenoico) e de 2-4% do ácido auricólico (ácido 14-hidroxi- 17- *cis*-eicosenoico). Estas características são resultado de um processo evolutivo que fornece a estas sementes vantagens frente a predação e às doenças (MCKEON et al., 2016).

O ácido ricinoléico possui 18 átomos de carbono e uma dupla ligação *cis* entre os carbonos 9 e 10, assim como ocorre com o ácido oléico, ele difere deste e da maioria dos outros ácidos graxos, de ocorrência natural, por apresentar uma hidroxila no carbono 12 de

sua cadeia. A presença do grupamento hidroxila nas proximidades da ligação *cis* confere características estruturais e funcionais que, não somente proporcionam ao óleo de mamona algumas de suas propriedades intrínsecas, mas também ativam a molécula, tornando-a acessível a muitas reações químicas que lhe confere as propriedades químicas incomuns dentro da categoria óleos vegetais (ISBELL et al., 2006; JÚNIOR et al., 2011; MCKEON et al., 2016).

Figura 6: Estrutura química do ácido ricinoléico

Dentre as propriedades conferidas pela estrutura singular deste ácido, se destacam a alta massa molar, elevada viscosidade, elevada miscibilidade em álcool, baixos pontos de fusão (5°C) e baixíssimos pontos de solidificação (-12°C à -18°C) (MCKEON et al., 2016), o que contribui para o interesse industrial dos seus derivados.

Atualmente, a hidrólise industrial do óleo de mamona para produzir ácidos graxos livres (AGLM), ricos em ácido ricinoléico livre (ARL), é realizada por via térmica, que utiliza temperaturas bem elevadas, ou por via química (geralmente usando catalisadores alcalinos) ou ainda por saponificação seguida de acidificação (GOMES et al., 2013; MAHER; BRESSLER, 2007; SALIMON; ABDULLAH; SALIH, 2011), o que pode causar oxidação do produto final. Estes últimos procedimentos, apesar de utilizarem temperaturas amenas (70 – 100 °C), em comparação com a hidrólise térmica, fornece um produto com alterações de cor e odor e uma grande quantidade de borra ácida e água dura no processo, além da formação de uma glicerina de baixa qualidade (GOMES et al., 2013; SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011). Além disso, os processos que exigem elevadas temperaturas e pressões podem levar a formação de oligômeros do ácido ricinoléico, conhecidos como estolídeos (GOSWAMI et al., 2010). Sendo assim, apesar dos métodos apresentados apresentarem, normalmente, menor tempo de hidrólise, é desejável que estes processos sejam mais eficientes, com altos rendimentos, menor quantidade de subprodutos e um menor número de etapas. Dentro deste contexto, o uso de biocatalisadores, como as lipases, podem ser uma estratégia

interessante para a hidrólise do óleo de mamona (AVELAR et al., 2013; GOMES et al., 2013; HERMANSYAH et al., 2007; NOOR; HASAN; RAMACHANDRAN, 2003; SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011).

3.4 Biolubrificantes

O termo biolubrificante se refere a todo lubrificante biodegradável que é projetado de forma a maximizar o seu desempenho para responder as demandas dos equipamentos mais modernos. O conceito de biodegradabilidade está relacionado a capacidade do biolubrificante ser decomposto em um intervalo de até 1 ano, pelos ensaios padrão de biodegradabilidade, por micro-organismos presentes em solos carbonosos atóxicos, formando água, dióxido de carbono ou metano, e terra carbonácea (SALIMON; ABDULLAH; SALIH, 2011; SILVA, 2012).

Apesar dos biolubrificantes ainda comporem um segmento limitado algumas aplicações equivalentes aos óleos minerais já são encontradas como utilização em: fluidos hidráulicos, fluidos de perfuração, óleos de turbina, óleos de engrenagens industriais, compressor, refrigeração, e motor, fluidos de máquina e metalúrgicos, óleos de cárter, óleos para processamento de alimentos, graxas biodegradáveis entre outros (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; MADANHIRE; MBOHWA, 2016). Outras áreas de aplicação são indústrias de cosméticos, têxteis e fibras, líquidos de troca térmica e indústrias de plásticos (LÄMSA, 1995). Devido a isto, os estudos se voltaram para a investigação de materiais naturais como resíduos de óleo orgânico, gordura animal e os óleos vegetais como substratos à produção de biolubrificantes (KANIA et al., 2015; PANCHAL et al., 2017; SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2012a).

Na década de 80 foram desenvolvidos óleos biodegradáveis para motosserras baseados em ésteres naturais a partir de triglicerídeos de óleo de canola (LÄMSA, 1995). Na Europa ocidental já foram introduzidos, desde a década de 90, óleos de motores a gasolina compostos de misturas 1:1 de ésteres orgânicos com PAOs ou óleos provenientes de hidrocraqueamento e os aditivos convencionais na tentativa de estarem de acordo com as regulamentações ambientais. No entanto, estes lubrificantes somente estarão de acordo

com os requisitos ambientais, em termos de biodegradabilidade e volatilidade, se a fração de ésteres for aumentada (SIEGEL; SKIDD, 1995). Ainda nos anos 90, várias empresas americanas tais como a Lubrizol Co, de Ohio, seguiram a mesma tendência européia. A referida empresa investiu quantidades significativas em P&D para desenvolver aditivos extremamente efetivos a partir do óleo de girassol com alto teor de ácido oléico. Além disto, a patente do primeiro fluido hidráulico de trator com base em óleo de soja foi desenvolvida na mesma época, pelo centro de pesquisas de biolubrificantes da *University of Northern Iowa*, o NABL (National Ag-Based Lubricants Center) (HONARY, 2009).

No entanto, os primeiros produtos desenvolvidos apresentaram baixo desempenho e/ou altos custos devido ao fato de que o grande destaque era dado à compatibilidade ambiental destes produtos e não na questão econômica ou seu desempenho. Assim, no final da década de 90, todas as tecnologias verdes foram reduzidas ou mesmo eliminados de muitas empresas americanas e as pesquisas continuaram a serem realizadas apenas em laboratórios acadêmicos e governamentais (SILVA, 2012).

A compatibilidade ecológica, desempenho técnico, robustez, durabilidade, e preços acessíveis são a base para futuros desenvolvimentos nesta área. Entre as fontes renováveis, os óleos vegetais têm se sobressaído como matérias-primas para a produção de biolubrificantes (FOX; STACHOWIAK, 2007; HSIEN, 2015; LÄMSA, 1995; MADANHIRE; MBOHWA, 2016; MOBARAK et al., 2014; PANCHAL et al., 2017; QUINCHIA et al., 2014), uma vez que apresentam, segundo KANIA et al. (2015); MADANHIRE & MBOHWA (2016) e MAKKONEN (1994) as seguintes características:

- Excelentes propriedades tribológicas (durabilidade do filme protetor);
- Baixa volatilidade (20% menos voláteis quando comparados aos óleos minerais);
- Altos índices de viscosidade (óleos com multi-aplicabilidade);
- 99% de biodegradabilidade;
- Não apresentam poder corrosivo;

Pelas propriedades apresentadas acima, tem-se a comprovação da possibilidade de aplicação dos óleos vegetais como base para a produção de biolubrificantes. Além disso, a produção de biolubrificantes de base vegetal é, no Brasil, uma grande vantagem competitiva, uma vez que o país apresenta destaque no cenário agrícola mundial e há

perspectiva de crescimento desse mercado não somente no Brasil como no mundo (BAIN & COMPANY; GAS ENERGY, 2014b).

Fora a comprovação técnica, a utilização de óleos vegetais também tem utilidade social, uma vez que poderá gerar empregos para todas as camadas da população, promovendo o desenvolvimento, evitando o êxodo rural e favorecendo uma melhor distribuição de renda. Além disso, como se trata de um produto biodegradável, eles entram no ciclo natural de qualquer material orgânico, não degradando o ambiente ou gerando um produto não retornável, conforme pode ser visto na Figura 7 (SOARES, 2013b).

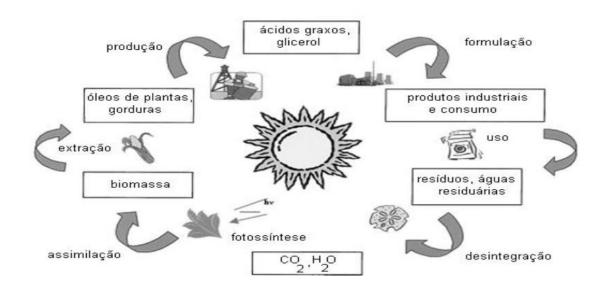


Figura 7 Ciclo de vida de lubrificantes produzidos de fontes renováveis (WILLING, 2001).

Os principais tipos de ésteres utilizados como biolubrificantes são: ftalatos, trimetilatos, diésteres, C36 dimetiratos e ésteres de álcoóis polihidroxilados (poliálcool) que também são conhecidos como poliolésteres. As estruturas químicas destes biolubrificantes podem ser visualizados na Figura 8.

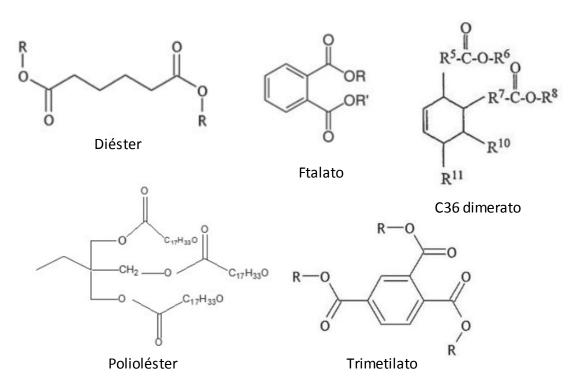


Figura 8 Exemplos dos principais ésteres utilizados como biolubrificantes

Ultimamente, os ésteres derivados do ácido ricinoléico têm sido sugeridos na literatura como potenciais biolubrificantes (AZEVEDO; LIMA, 2001; DOLL et al., 2017; GARCÍA-ZAPATEIRO; VALENCIA; FRANCO, 2014; JÚNIOR et al., 2011; POTULA et al., 2014; SILVA, 2012), porém a sua estabilidade oxidativa é questionada devido à hidroxila livre no carbono 12 do ácido ricinoléico. No entanto, se esta hidroxila for esterificada o produto desta reação tornar-se-á mais estável (YAO et al., 2010).

3.5 Formas de obtenção de biolubrificantes

Ultimamente, com o mercado crescente visando o desenvolvimento de lubrificantes biodegradáveis, diversas rotas que envolvem a modificação química dos óleos vegetais têm sido desenvolvidas. Estas reações têm como objetivo principal a melhoria das capacidades lubrificantes inerentes aos óleos vegetais bem como aquelas nas quais não apresentam boa funcionalidade como as estabilidades oxidativa e térmica. Para se produzir um

biolubrificante é necessário formar ésteres que podem ser obtidos por diversas reações catalisadas química (MCNUTT; HE, 2016; PANCHAL et al., 2017) ou enzimáticamente. A catalise enzimática, em geral, envolve o uso de lipases e esterases (ÅKERMAN et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2018; DA SILVA et al., 2015; DÖRMO et al., 2004; GRECO-DUARTE et al., 2017; HAJAR; VAHABZADEH, 2014a; LAGE et al., 2016; MALHOTRA; MUKHERJEE; GUPTA, 2015; TRIVEDI et al., 2015).

3.6 Lipases e esterases: mercado de enzimas

O mercado mundial de enzimas voltadas para as indústrias tem valor estimado de US\$ 2,3 bilhões/ ano em um senso realizado em 2007 e segue três principais eixos de atuação: enzimas para alimentos e bebidas; enzimas para ração animal; e, enzimas que são destinadas a indústrias de tecidos e de produtos de limpeza. Neste mercado, as lipases estão em terceiro lugar, atrás apenas das proteases e amilases em volume de venda (FERNANDES; MILAGRES; MUSSATTO, 2007; LAGUERRE et al., 2017).

O mercado brasileiro de enzimas representa cerca de 2% do total mundial no qual as exportações de enzimas chegaram à US\$ 3 milhões e as importações a US\$ 31 milhões. As amilases são as mais importadas (US\$ 4 milhões), seguidas de proteases (US\$ 2,5 milhões). Apesar de ser bem inferior ao mercado mundial, o mercado brasileiro apresenta grande potencial crescimento. No Brasil, a grande geração de resíduos agroindustriais podem servir como substrato para a fermentação de micro-organismos produtores de enzimas que poderão ser utilizadas nas indústrias de alimentos, medicamentos, tecidos e celulose/papel, o que conduz ao maior interesse em se desenvolver tecnologias verdes (FERNANDES; MILAGRES; MUSSATTO, 2007; FERREIRA-LEITÃO et al., 2017; PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008).

As principais razões que justificam o potencial de aplicação biotecnológica não somente das lipases e das esterases como das enzimas em geral são: a) atuação em condições ambientes/medianas de temperatura, pressão e pH; b) alta estabilidade em solventes orgânicos; c) especificidade pelo substrato; d) altas régio e enantiosseletividade; e e) o fato de serem ambientalmente compatíveis constituindo uma tecnologia verde de substituição as rotas catalisadas quimicamente (FERREIRA-LEITÃO et al., 2017; LAGUERRE et

al., 2017). Sendo assim, um dos principais motivos para este aumento na produção e comercialização das lipases é a constatação destes benefícios, o que traz vantagens no desenvolvimento de tecnologias alternativas, para serem industrialmente empregadas.

Apesar de promissora a utilização industrial de lipases ainda apresenta alguns desafios a serem superados como, por exemplo, a diminuição dos custos de produção. Estes custos podem ser minimizados por meio de melhoramento genético das cepas produtoras e imobilização com consequente estabilização que permitam o reuso do biocatalisador e muitas vezes, a hiperativação da enzima (CAI et al., 2018; JAEGER; EGGERT, 2002; PALOMO et al., 2006; RODRIGUES; BERENGUER-MURCIA; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2011; SILVA, 2012; VOLPATO, 2009).

Os trabalhos encontrados na literatura que retratam a produção de biolubrificantes por catalise enzimática, a partir de óleos vegetais, envolvem a utilização de lipases e/ou esterases produzidas por diversos micro-organismos, dentre os quais, *Rhizomucor miehei, Candida antarctica* e *Candida rugosa* (AGUIEIRAS et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2018; HAJAR; VAHABZADEH, 2014b; MALHOTRA; MUKHERJEE; GUPTA, 2015; SALIMON et al., 2011).

3.6.1 Lipases e esterases: características gerais

Diferenciar os conceitos de lipases e de esterases é uma tarefa árdua possivelmente devido ao fato de ambas serem versáteis e catalisarem basicamente a mesma diversidade de reações. A definição de esterases frente às lipases ainda é bastante discutida e ao longo dos anos gerou diversos trabalhos na tentativa de diferenciá-las. Apesar de todos os esforços e de terem sido propostos critérios de distinção, nenhum deles obteve consenso na comunidade científica. Apesar disso foi sugerida uma reorganização, apenas de uma forma pragmática, que divide o grande grupo das carboxilester hidrolases em esterases lipolíticas (LEst ou lipases: EC: L3.1.1.1) e esterases não-lipolíticas (NLEst: EC: NL3.1.1.1) (ROMANO et al., 2015).

Uma possível diferença está no conceito que, por definição, a função natural das lipases é a de catalisarem a hidrólise de ligações éster presentes em triacilgliceróis de cadeia longa, liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos. Não há definição

explícita para o termo triacilglicerol de "cadeia longa", no entanto, acredita-se que os "substratos padrão" para as lipases sejam aqueles cujas cadeias contenham mais que 8 átomos de carbono. É importante ressaltar que as lipases são capazes de hidrolisar ésteres de cadeias menores, diferentemente das esterases que somente hidrolisam ésteres com cadeias cujo tamanho seja menor que 8 átomos de carbono (ROMANO et al., 2015). Sendo assim, pode-se inferir que todas as reações catalisadas pelas esterases são catalisadas pelas lipases, mas nem todas as reações catalisadas pelas lipases poderão ser catalisadas pelas esterases. É comum o consenso de que lipases são esterases que agem em acilgliceróis de cadeias longas (JAEGER; DIJKSTRA; REETZ, 1999; MANCHEÑO et al., 2003). O triacilglicerol é apenas um exemplo frente a todos outros compostos que podem ser substratos destas enzimas, sejam eles de baixa ou de alta massa molar. Os substratos possíveis para as lipases são variados e vão desde amidas e tioésteres aos hidroxiácidos, tais como o ácido ricinoléico (PAQUES; MACEDO, 2006).

Apesar dos esforços na renomeação dos grupos, ainda vale a nomenclatura oficial designada pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB) na qual as lipases e as esterases estão dentro do grupo EC 3.1.1 cuja classificação é de hidrolases éster carboxílicas ou ainda hidrolases. As esterases ou carboxilesterases (EC 3.1.1.1) são sistematicamente classificadas como hidrolases éster carboxílicas bem como o nome do grupo e as lipases ou triacilglicerol lipases (EC 3.1.1.3) sistematicamente classificadas como triacilglicerol acilhidrolases. A função natural destas enzimas é, como dito acima, a hidrólise em meio aquoso de ligações éster liberando ácidos graxos e álcool, como pode ser visto na Figura 9.

Figura 9 Esquema hipotético de uma reação de hidrólise (sentido direto) de um triacilglicerol catalisada por lipases ou esterases produzindo glicerol e ácidos graxos ($R^1 = ou \neq R^2 = ou \neq R^3 = ou \neq R^1 \mid R^1 < 8$ átomos de carbono).

No entanto, em ambientes restritos em água estas enzimas são capazes de catalisar reações reversas como a esterificação de ácidos graxos livres com um álcool, por exemplo o glicerol (Figura 9). Outras reações utilizando o mesmo mecanismo – que será visto no tópico 3.6.2 - também poderão ser realizadas como a interesterificação, a transesterificação, acidólise e aminólise (Figura 10) (JAEGER; REETZ, 1998; PAQUES; MACEDO, 2006; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

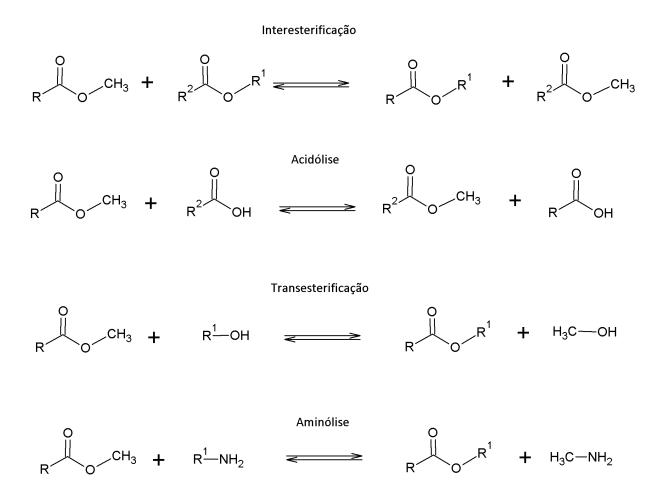


Figura 10 Esquema representando exemplos de reações catalisadas pelas lipases (modificado de PAQUES; MACEDO, 2006)

As lipases e as esterases são biocatalisadores que podem ser aplicadas em diversas reações, motivo que justifica o crescimento de sua atuação no mercado internacional. A estimativa é de que a participação destas enzimas chegue a níveis comparáveis com os das proteases que representam 25-40% das vendas de enzimas industriais.

Além de atuar em diversas reações, estas enzimas possuem elevada estabilidade e eficiência, assim como propriedades químio-, régio- e/ou enantiosseletivas, que as tornam muito atraentes e versáteis (FREIRE; CASTILHO, 2008; ROMANO et al., 2015). Esta versatilidade provém de um fenômeno descrito na literatura como "promiscuidade enzimática" (COSTA, 2011; HULT; BERGLUND, 2007; KAPOOR; GUPTA, 2012) uma vez que uma mesma enzima pode atuar em grupos funcionais e substratos distintos (promiscuidade enzimática do substrato), sobre diversas condições reacionais (promiscuidade enzimática de condição), e/ou em diferentes transformações químicas e com diferentes estados de transição (promiscuidade catalítica). As lipases e as carboxilesterases são as enzimas descritas pela literatura como as enzimas mais promíscuas. Elas possuem ampla versatilidade de substratos, no entanto, apresentam elevada especificidade como régioespecificidade (distinção entre as posições 1 e 3 dos triacilgliceróis); especificidade em termos de ácidos graxos e do álcool presente na síntese/hidrólise e estéreoespecificidade. Estas enzimas, em geral, também apresentam estabilidade em condições extremas de pH, temperaturas e também estabilidade em presença de solventes orgânicos (KAPOOR; GUPTA, 2012).

Normalmente, as lipases são encontradas na natureza, sendo produzidas por eucariotos multicelulares (animais e plantas) e micro-organismos em geral, presentes nos 3 domínios (Eukarya, Archaea e Bacterya). As lipases de origem animal são responsáveis pelo metabolismo de lipídios e nas plantas, estão presentes nos tecidos de reserva de energia de diversas espécies (SHARMA et al., 2001), sendo também encontradas nas sementes de diversas angiospermas como a mamona – *Ricinus communis* (GRECO-DUARTE et al., 2017), o pinhão manso – *Jatropha curcas* (DE SOUSA et al., 2010), entre outras diversas como girassol (*Heliantus annuus* L.) e trigo (*Triticum aestivum* L.) (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010).

No caso da produção industrial, não somente das lipases e das esterases como de qualquer enzima, maior destaque é dado àquelas produzidas por micro-organismos, uma vez que estes possuem menor tempo de geração, grande versatilidade de condições de operação, pois são encontrados nos mais diversos ambientes desde gelo até lava de vulcões, e a facilidade de manipulação tanto geneticamente, visando aumentar sua capacidade de produção, quanto em relação as suas condições de cultivo (PEREIRA JR.; BON; FERRARA, 2008; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001). Além disto, as lipases microbianas são de grande

interesse biotecnológico devido às elevadas estabilidade, seletividade e especificidade de substrato, quando comparadas a outras enzimas (KAPOOR; GUPTA, 2012).

3.6.2 Estrutura e mecanismo de atuação

As hidrolases, de modo geral, compartilham a mesma estrutura conhecida como "dobras α/β das hidrolases" cuja composição consiste numa folha- β central conectada por α -hélices que envolvem o núcleo protéico. Muitas das lipases contêm uma alça polipeptídica anfifílica, cuja composição é variável, associada a estas dobras, normalmente cobrindo o sítio ativo, conhecida como tampa (em inglês *cap* ou *lid*) como pode ser visto na Figura 11 (JAEGER et al., 1994; ROMANO et al., 2015).

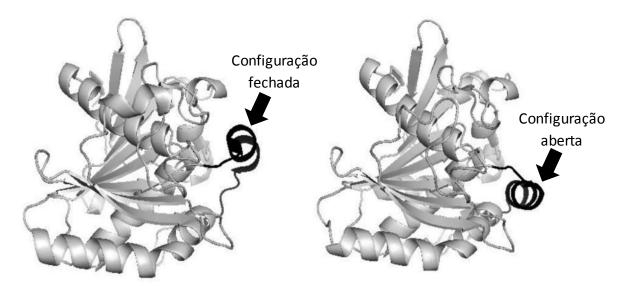


Figura 11 Lipase de *Rhizomucor miehei* em suas configurações de tampa aberta e fechada (RODRIGUES et al., 2013).

A função desta alça polipeptídica nas lipases é normalmente associada ao fenômeno conhecido como "ativação interfacial". Esta característica vem sendo bastante explorada no ramo de imobilização destas enzimas para manter a mesma imobilizada em sua configuração mais ativa (forma aberta) melhorando a sua atuação (RODRIGUES et al., 2013). Para que este fenômeno ocorra é necessário que haja a presença de uma interface na qual as duas fases, orgânica e aquosa, coexistam. Sem esta interface, a enzima assume a configuração fechada

em que o sítio ativo fica completamente isolado do meio reacional sendo assim considerada a "conformação inativa". Entretanto, quando a enzima entra em contato com esta interface ocorre uma modificação na conformação da tampa que se altera da configuração fechada para a configuração aberta no que se conhece como a "conformação ativa". Nesta configuração os resíduos hidrofóbicos que compõem a superfície do sítio ativo ficam expostos aumentando a interação hidrofóbica e liberando o acesso do substrato hidrofóbico ao sítio ativo formando um complexo enzimático ativado (JAEGER; REETZ, 1998; ROMANO et al., 2015; SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Outros estudos mostraram que as lipases que não têm uma estrutura como esta "tampa" têm sua atividade enzimática reduzida e sofrem uma alteração na sua especificidade pelo substrato. Além de casos nos quais os resíduos constituintes da tampa podem afetar a especificidade reacional das mesmas. Estes resultados fortalecem o conceito de que esta "tampa" exerce uma importante função na modulação não somente da atividade, mas também da especificidade, enantioseletividade e estabilidade das lipases (RICCARDI et al., 2017; SECUNDO et al., 2006).

Segundo JAEGER et al. (1994) algumas lipases como de *Pseudomonas aeruginosa* e de *Pseudomonas glumae* apresentam tampa, porém não apresentam ativação interfacial. Estudos recentes por cristalização demonstraram, no entanto, que além de apresentar a ativação interfacial, as lipases de *Pseudomonas aeruginosa* apresentam duas tampas e não somente uma como a maioria das lipases. Tal fato pode ser observado por estudos de cristalização e de simulações dinâmicas moleculares nos quais foi determinado que a primeira tampa estaria entre os resíduos 125 aos 148 e a segunda do resíduo 210 ao 222. Foi sugerido que a segunda tampa agiria como um ativador à movimentação da primeira tampa (CHERUKUVADA et al., 2005). Além disso, algumas lipases como a de *Staphylococcus hyicus* mostram ativação interfacial somente com alguns substratos sendo capaz de catalisar a hidrolise de acilgliceróis e de fosfolipídeos, no entanto, sua ativação interfacial ocorre com a presença de tributirina no meio reacional e não acontece com diheptanoil-fosfocolina (JAEGER et al., 1994) o que evidencia que a presença da tampa e sua composição pode também regular a especificidade destas enzimas. Há ainda aquelas lipases que não apresentam tampa como a lipase B de *Candida antarctica* (JAEGER; REETZ, 1998).

As proteínas que compõem a família das hidrolases parecem também compartilhar, fundamentalmente, do mesmo mecanismo de atuação que conta com a presença de uma tríade catalítica composta por uma porção nucleofílica — que consiste em resíduos de serina, aspartato ou cisteína -, uma histidina e um ácido carboxílico - que pode ser um aspartato ou um glutamato (ROMANO et al., 2015). No caso das lipases e das esterases, elas são caracterizadas como serino hidrolases tendo mecanismo semelhante ao das serino-proteases sendo o nucleófilo composto por uma serina (JAEGER et al., 1994).

O mecanismo clássico envolve a formação de dois intermediários sendo um tetraédrico e o outro intermediário acilenzima envolvendo o ataque nucleofílico do grupamento hidroxila do resíduo de serina pelo carbono da ligação éster do substrato. O resultado deste ataque é a formação de um intermediário tetraédrico que posteriormente perde a molécula de álcool formando um intermediário composto por acil-enzima. Finalmente este intermediário perde a porção acil devolvendo à enzima sua forma nativa (JAEGER et al., 1994).

Este mecanismo hidrolítico de ação das lipases e esterases pode ser visto Figura 12 e será separado em (a), (b), (c), (d) e (e), conforme apresentado na Figura apenas como um recurso para melhor explicá-la segundo JAEGER et al. (1994).

- (a) A hidrólise começa com o ataque nucleofílico à carbonila (C=O) do substrato pela hidroxila do resíduo de serina presente na tríade catalítica que compõe o sítio ativo. Este resíduo de serina estava ligado com o resíduo de histina por uma interação entre o hidrogênio da hidroxila e o anel imidazólico da histidina;
- (b) Este anel imidazólico, por sua vez, incorpora o próton do grupo Ser OH adquirindo uma carga total positiva que é equilibrada pelos resíduos de ácido (aspartato ou glutamato) que tem carga negativa. Concomitantemente, é formado o primeiro intermediário tetraédrico, estabilizado por duas ligações hidrogênio com as ligações amida dos resíduos pertencentes ao "buraco do oxiânion" que é formado por resíduos os quais são utilizados como estrutura para constituir ligações hidrogênio, estabilizando assim a carga negativa proveniente do oxigênio da carbonila;

- (c) o próton incorporado pelo anel imidazólico da histidina é transferido, quebrando o intermediário tetraédrico e liberando uma molécula de álcool. O grupamento ácido retoma a dupla ligação da carbonila e se torna ligado covalentemente com o resíduo de serina formando um intermediário acilenzima;
- (d) a histidina então ativa nucleofilicamente a molécula de água tornando seu anel imidazólico novamente protonado- que hidrolisa a ligação covalente do intermediário com a serina via ataque nucleofílico no carbono da carbonila do intermediário acilenzima, desfazendo a dupla ligação (C=O); (e) a histidina então doa seu próton ao resíduo de serina que libera como produto a porção ácida do substrato e a enzima retorna a sua configuração natural.

O mecanismo das reações realizadas pelas hidrolases éster carboxílicas, tais como as lipases e as esterases, nos conduz ao entendimento de que a variedade de reações ocorre devido à modificação do nucleófilo que ataca o intermediário acilenzima, gerando diferentes produtos provenientes de diferentes tipos de reações.

Figura 12 Esquema representando o mecanismo de uma reação de hidrólise de éster catalisada por esterases e lipases. O substrato (éster) bem como os produtos da reação (ácido carboxílico e álcool) são apresentados em vermelho. Por sua vez, a tríade catalítica e a água estão em preto e, em azul, são representados os resíduos do buraco do oxiânion. As etapas (a), (b), (c), (d) e (e) estão explicadas no texto que precede a figura (ALMEIDA, 2005 modificado de JAEGER et al., 1994)

O conceito de um mecanismo contendo duas etapas foi recentemente contestado devido à exploração computacional da reação sugerindo uma melhoria no conceito que envolve quatro etapas com a formação de dois intermediários tetraédricos além do intermediário acilenzima. Fora isso, os autores discutem e elucidam dúvidas até então não compreendidas pelo modelo anterior além de complementar diversas informações como o fato de que o primeiro intermediário tetraédrico é estabilizado não somente por duas mas por três ligações hidrogênio proporcionadas pelos grupos NH dos resíduos do buraco do oxiânion que é formado por resíduos de glicina (Gly 92 e 93) e o átomo estrutural de nitrogênio do resíduo de alanina (Ala 170). Ainda, estas interações são fundamentais, pois

promovem o alinhamento do C5 do substrato com o resíduo de serina o que é uma condição fundamental para o início do processo catalítico (ARANDA et al., 2014).

Outra hipótese baseada na comparação de estruturas de raios-X de diversas lipases/esterases é que as diferentes conformações do oxiânion podem controlar qual nucleófilo (álcool ou água) é favorecido no ataque nucleofílico do intermediário acilenzima ativando ou inativando o ataque da água por meio de uma segunda molécula de água (JIANG et al., 2011).

3.6.3 Classificação da especificidade das lipases

A especificidade das lipases podem ser divididas em 3 grupos principais (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010; DE CASTRO et al., 2004; KAPOOR; GUPTA, 2012; PAQUES; MACEDO, 2006; ROMANO et al., 2015) de acordo com as suas quimio-, régio – e enantiosseletividades.

- lipases regiosseletivas: A especificidade estrutural ou regiosseletividade é decorrente da orientação imposta pelas dimensões e pela estrutura do sítio ativo à ligação do substrato sendo observada tanto nas lipases quanto nas esterases, entretanto somente nas lipases esta divisão é mais explorada. Estas restrições levam à distinção e à transformação seletiva de funções quanto à hidrólise, as lipases apresentam regiosseletividades que podem ser dividida em 3 grupos principais:
- ♣ lipases não específicas: que catalisam a hidrólise randômica de triacilgliceróis de forma a obter ácidos graxos provenientes das posições 1, 2 ou 3 e glicerol (ex: produzidas por Candida rugosa, Candida antarctica, Staphylococcus aureus, Chromobacterium viscosum e Pseudomonas sp.);
- ❖ lipases 1,3-específicas: que catalisam as ligações 1,3 dos triacilgliceróis formando ácidos graxos, 2- monoaciglicerol, 1,2 e/ou 2,3 diacilglicerol, sendo estas últimas estruturas instáveis e por isso passíveis de sofrer reorganização do grupamento acil que migram lentamente formando 1,3 diacilglicerol e 1- ou 3- monoacilgliceróis o que os torna

um substrato hidrolisável por estas enzimas (ex: de *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus niger*, *Mucor javanicus*, *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Rhizopus oryzae*, *Candida lipolytica*, *Rhizopus niveus* e *Penicillium roquefortii*);

❖ lipases específicas por ácidos graxos: estas lipases também hidrolisam triacilgliceróis em quaisquer uma das 3 posições, no entanto são específicas para um grupo ou um tipo de ácido graxo. Este tipo de especificidade não é comum entre as lipases e o exemplo mais estudado até hoje é a lipase de *Geotrichum candidum*.

Existem também estudos que comprovam que algumas lipases podem ser 2-específicas tal como a lipase A de *Candida antarctica* (ZINNI et al., 2004).

- Enantiosseletivas: não somente as lipases como também as esterases tem a habilidade de discriminar enantiômeros (R- e S-isômeros) em misturas racêmicas sendo considerada uma das maiores aplicações na indústria das esterases. A enantioseletividade pode variar de acordo com o substrato e pode estar conectada a natureza do éster (LUNDELL; RAIJOLA; KANERVA, 1998).
- Lipases seletivas quanto ao tamanho da cadeia de carbonos e ao número de insaturações presentes na cadeia de carbonos dos ácidos graxos (PAQUES; MACEDO, 2006).

3.6.4 Lipase/esterase de Candida rugosa

As lipases de *C. rugosa* (CRL) foram descritas pela primeira vez na década de 60, década na qual duas isoenzimas foram identificadas e denominadas inicialmente como Lip A e Lip B. Atualmente, a nomenclatura Lip A e B foi abandonada, uma vez que existem pelo menos sete genes envolvidos na produção das CRLs, passando a ser nomeadas pela numeração das enzimas de Lip 1 à Lip 7, sendo as enzimas Lip 1 a 5 já bem caracterizadas bioquimicamente (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006a). As Lips 1, 2, 3, 4 e 5 possuem cerca de 70% de semelhança na sequência de aminoácidos que as origina sendo consideradas isoenzimas. Todas apresentam massa molar em torno de 60 kDa e, entre elas, poucas

diferenças são encontradas em termos de ponto isoelétrico e grau de glicosilação (FERRER et al., 2001, 2009).

O estudo das Lips 1 e 3 por cristalização permitiu determinar que, apesar de diferirem quanto à especificidade de substrato, elas compartilham 88% da sequência de aminoácidos. Enquanto a Lip 1 hidrolisa preferencialmente triacilglicerídeos com quase nenhuma especificidade pela cadeia de ácidos graxos. A Lip 3, além de triacilgicerol, é capaz de hidrolisar colesterol, sendo encontrada na sua forma purificada como um extrato comercial de nome colesterol esterase (Sigma) (CYGLER; SCHRAG, 1999). Uma resolução das Lips 1, 2 e 3 foi feita na sua conformação fechada, que mostrou que a Lip 2 apresenta 79.4% de identidade da sequência de aminoácidos com a Lip 1 e 82,2% com a Lip 3. Apesar das regiões essencialmente identicas entre as três enzimas, o conteúdo de fenilalanina é específico para cada uma das Lips, que resulta em diferentes ambientes catalíticos, e que provavelmente se ajusta ao carácter de lipases/esterases principalmente da Lip 2 e 3 (MANCHEÑO et al., 2003). Segundo MANCHEÑO et al., (2003) a Lip 2 chega a ter atividade específica esterásica (afinidade por soluções aquosas com ésteres solúveis de cadeias curtas) duas vezes maior do que a Lip 3.

Diferentes fermentações podem levar a diferentes concentrações de lipases e perfis isoenzimáticos. Devido a isto, a produção das isoenzimas é apontada como um dos fatores mais importantes para explicar a falta de reprodutibilidade biocatalítica em meio orgânico, quando se utiliza o extrato bruto de CRLs (DALMAU et al., 2000; DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006a). A CRL comercial é uma enzima que se destaca na literatura pelo uso frequente em biotransformações. No entanto, a obtenção de CRL recombinante é um desafio à pesquisa já que a levedura *C. rugosa* utiliza um código genético não universal no qual o códon que normalmente expressa a leucina, CUG, é expressado como serina (ALBERGHINA; LOTTI, 1997; CYGLER; SCHRAG, 1999; DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006b; FERRER et al., 2009).

Por comparação entre sequências de aminoácidos, as CRLs pertencem a uma família de proteínas que contém em sua maior parte esterases, o que explica o caracter ambíguo lipase/esterase descrito para as CRLs. Dentro desta família existem ainda outras lipases como as de *Geotrichum candidum* – com a qual as CRLs contêm 40% de identidade - e a de

Galactomyces geotrichum. Outros membros desta família incluem acil e butirilesterases, carboxilesterases e colesterol esterases (CYGLER; SCHRAG, 1999; MANCHEÑO et al., 2003).

O sitio ativo das CRLs é composto por resíduos de Ser-His-Glu, tais quais as serino proteases da família das hidrolases e também possuem as dobras α/β características das hidrolases (tópico 3.6.2). O sítio ativo é coberto por uma tampa anfifílica composta por uma estrutura em α -hélice dos resíduos de aminoácidos 65 ao 94. A composição de aminoácidos varia entre as isoformas sendo apenas 14 deles conservados nas estruturas das tampas das Lips 1, 2 e 3 o que explica a variedade de especificidade encontrada entre as isoenzimas (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006a; MANCHEÑO et al., 2003).

As lipases de *C. rugosa* e *Geotrichum candidum* possuem em seus sitios ativos a presença de um túnel de acomodação do substrato somente encontrado nestas enzimas. Este túnel apresenta uma conformação em "L", que aparentemente encaixaria perfeitamente com a conformação estrutural do ácido oléico que possui uma insaturação entre os carbonos 9 e 10. Assim, apesar da CRL ser não específica catalisando a reação de diversos ácidos graxos e diversos tamanhos de cadeia ela apresenta baixas atividades frente a substratos com mais de uma insaturação (poli-insaturados) como o ácido linolênico (18:3) (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006a). A composição em residuos de aminoácidos varia as proporções de fenilalanina entre as lips 1, 2 e 3 influenciando suas características esterásicas, uma vez que a Lip 2 e 3 possuem tunéis menores (95 e 93 Å) do que a Lip 1 (135 Å) (MANCHEÑO et al., 2003) que, portanto, comporta substratos maiores exibindo sua característica lipásica e diferenciando-a da demais.

O estudo dos extratos enzimáticos comerciais de *C. rugosa* permitiram avaliar a maior presença da Lip 1 em detrimento das 2 e 3. Nestes extratos, foi possível também encontrar carboxilesterases/ tioesterases (DICZFALUSY; ALEXSON, 1996; SÁNCHEZ et al., 1999). DICZFALUSY & ALEXSON (1996) descobriram e purificaram duas esterases em torno de 40 kDa, YTE-1 e YTE-2, com características cinéticas semelhantes, sendo apenas a primeira caracterizada em detalhes. Ambas foram denominadas como específicas para cadeias longas de acil-CoA- tioesterases (*long-chain acyl-CoA thioesterases*). Os estudos realizados sugeriram que estas esterases pertencem a uma nova família de serino esterases presentes em leveduras. Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa publicou um novo

método que possibilita realizar transesterificação em gel nativo ou desnaturante de eletroforese, que permitiu identificar a banda de 40 kDa nos extratos comerciais de CRL como a responsável pela reação de transesterificação do biodiesel de mamona com TMP (DUARTE et al., 2016). Recentemente, foi publicado um artigo sobre a utilização da célula de *C. rugosa* (*whole-cell*) com atividade de oxiredutase (NIE et al., 2005).

3.7 Aplicação de enzimas na produção de biolubrificantes

Atualmente, a aplicação das lipases/esterases progressivamente vem conquistando seu espaço no ramo industrial. O LaBiM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana) em convênio com o CENPES/PETROBRAS têm desenvolvido, nos últimos anos diversas patentes e artigos com referência à produção de biodiesel e de biolubrificantes catalisado por estas enzimas (AGUIEIRAS et al., 2014, 2017; CASTRO et al., 2014; CAVALCANTI-OLIVEIRA et al., 2015; CAVALCANTI et al., 2018; DA SILVA et al., 2015; DUARTE et al., 2016; FERNANDES et al., 2017; GRECO-DUARTE et al., 2017).

A produção destes bioprodutos pode ser realizada por transesterificação ou hidroesterificação de óleos ou gorduras com alcoóis de cadeia curta, principalmente, metanol e etanol, no caso da produção de biodiesel e de álcoois de cadeia longa ou ainda álcoois polihidroxilados (poliálcoois) na produção de biolubrificantes. Outra forma seria a simples esterificação dos ácidos graxos livres provenientes da produção industrial como os derivados de óleo de palma e de soja (DDOS e DDOP, respectivamente). Além destes, existe também um movimento cada vez maior no sentido da criação de óleos vegetais modificados quimicamente, que permitiriam maior flexibilidade no uso de qualquer óleo vegetal como base, além de com a modificação química, ser possível melhorar os desempenhos tanto em termos fluidez a baixas temperaturas quanto em termos de estabilidade à oxidação. Os estolídeos são um exemplo destas novas técnicas de modificação química que também podem ser obtidos por via enzimática a partir do ácido ricinoléico (BÓDALO et al., 2009; GRECO-DUARTE et al., 2017; TODEA et al., 2015).

Apesar das vias químicas de produção de biodiesel e biolubrificantes a partir de óleos vegetais serem industrialmente bem estabelecidas, a transesterificação e esterificação em

escalas industriais são normalmente catalisadas por ácidos ou bases; uma catálise homogênea típica utiliza como catalisadores o ácido p-toluenossulfônico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, hidróxido de sódio, etóxido de sódio e metóxido de sódio (WAGNER; LUTHER; MANG, 2001). Sendo assim, a utilização de uma via enzimática, especificamente lipases ou esterases, se apresenta como uma alternativa interessante para redução dos impactos ambientais e a utilização de tecnologias verdes alternativas (SILVA, 2012).

3.8 Poliolésteres

Um dos exemplos mais estudados de biolubrificantes são os poliolésteres que são produzidos da reação de um álcool poli-hidroxilado – poliálcool – e ácidos carboxílicos ou dicarboxílicos (ÅKERMAN et al., 2011; AZIZ et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2018; FERNANDES et al., 2017; GRECO-DUARTE et al., 2017; OH et al., 2013) ou ainda pela reação de transesterificação entre um biodiesel de fonte diversa e um poliálcool (AZIZ et al., 2014; DA SILVA et al., 2015; OH et al., 2013). Os poliálcoois, diferentemente do glicerol, não têm a presença de um hidrogênio β, mas sim de um carbono quaternário no centro da molécula o que confere estabilidade ao produto final (WAGNER et al, 2001). Os ácidos utilizados na síntese de poliolésteres podem ser de cadeia longa ou curta, saturada ou insaturada, e linear ou ramificada, respeitando as relações que cada composição de ácido graxo tem com as propriedades finais do biolubrificante, conforme visto no tópico 3.3.1. Além disso, no caso da ausência de duplas conjugadas na composição do ácido graxo proveniente de óleo vegetal e, portanto, de hidrogênio bisalílicos, os derivados de poliálcoois terão elevadas estabilidades oxidativas e hidrolíticas, excelentes desempenhos a baixas temperaturas e alta biodegradabilidade (PETROVIC, 2008).

Os poliálcoois mais utilizados e conhecidos são o neopentilglicol (NPG), o trimetilolpropano (TMP) e o pentaeritritol (PE) que possuem respectivamente 2, 3 e 4 hidroxilas e suas fórmulas estruturais poderão ser visualizadas na Figura 13.

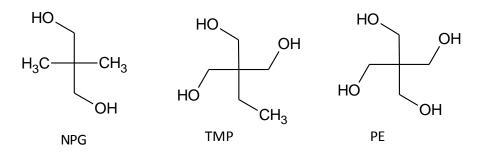


Figura 13 Estruturas moleculares dos poliálcoois: neopentilglicol (NPG), trimetilolpropano (TMP) e pentaeritritol (PE)

A maioria dos lubrificantes utilizados como fluidos de perfuração são derivados de poliálcoois. Apenas uma pequena quantidade destes fluidos são derivados de álcoois simples ou mono-hídricos, incluindo os ésteres alifáticos ou diésteres, que são provenientes de ácidos dicarboxílicos. No entanto, quando comparados aos diésteres, aqueles fluidos derivados de poliálcoois apresentam melhores desempenhos no que diz respeito à estabilidade oxidativa e térmica, índices de viscosidade e pontos de fulgor (KANIA et al., 2015).

Como exemplo de comercialização destes derivados de poliálcoois, a empresa Miracema-NUODEX comercializa o óleo proveniente da reação de ácido oléico e neopentilglicol, o LIOVAC® 4252, que apresenta baixa taxa de evaporação e baixa acidez. Além disso, possui excelentes propriedades de lubricidade e estabilidade química, com baixa tendência a sofrer hidrólise, sendo uma das suas aplicações a utilização como óleo básico em substituição total ou parcial do óleo mineral em formulações de óleo de corte. Também recomendado como agente de lubricidade para demais formulações de lubrificantes (MIRACEMA-NUODEX, 2018).

Diversos trabalhos trazem o estudo de reações com a utilização de poliálcooóis e fontes de óleos vegetais diversos. ÅKERMAN et al. (2011) estudaram a síntese de trioleato de trimetilolpropano (TMP), utilizando a lipase B de *Candida antarctica* (Novozym®435), e a água formada no meio reacional foi removida com a aplicação de vácuo conforme ia sendo formada. A remoção de água formada em reações de esterificação é fundamental para que não ocorra a reação de hidrólise do produto formada já que a água passa a funcionar como um aceptor de acil e os ésteres de poliálcoois como doadores de acil. O trioleato de TMP

apresentou propriedades interessantes para a aplicação em fluidos hidráulicos especialmente em temperauras elevadas. A eficiência reacional foi avaliada frente a variação de diversos parâmetros reacionais tais como a temperatura (60 – 100 °C), razão molar ácido oléico: TMP (1; 2; 3; 3,3 e 4,5:1) e concentração de enzima (0,5 – 7,5%). Como resultado os autores observaram que a formação do trioleato de TMP foi maior em temperaturas e concentrações enzimáticas mais elevadas na razão molar de 3,3. O produto formado nas condições otimizadas apresentou ponto de fluidez de –42 °C.

A aplicação de lipases imobilizadas de *C. antarctica, Pseudomonas cepacia* e *Rhizomucor miehei* foi realizada na síntese de ésteres lubrificantes a partir da transesterificação do biodiesel metílico de colza com 2-etil-1-hexanol, neopentilglicol e trimetilolpropano. Utilizando a lipase de *C. Antarctica* para o 2-etil-1-hexanol, neopentilglicol e trimetilolpropano, uma conversão de 98% dos substratos foi atingida em 50, 150 e 200 h respectivamente. As melhores propriedades foram encontradas no éster de 2-etil-1-hexanol cujo ponto de fluidez foi de -31,3, índice de viscosidade de 224, sendo as viscosidades a 40 e a 100 °C as mais baixas de 7,800 e 2,700 cSt, respectivamente. Por outro lado, os ésteres provenientes do NPG e do TMP tiveram resultados bem semelhantes ao óleo de colza sem nenhuma modificação química (GRYGLEWICZ; MUSZYŃSKI; NOWICKI, 2013).

Os registros encontrados na literatura que tratam da produção de ésteres de PE são relativos à produção por catálise química. AZIZ e colaboradores (2014) otimizaram os parâmetros da transesterificação do biodiesel metílico do óleo de palma e PE, usando como catalisador o metóxido de sódio, para a obtenção do tetra éster do biodiesel metílitico de palma pentaeritritol. As condições de temperatura, concentração do catalisador e a razão molar foram variadas atingindo o ótimo reacional de 158 °C; 1,19% (m/v) de catalisador, razão molar de 4,5:1 (biodiesel:PE) em 1 h de reação. Neste trabalho não foram avaliadas as propriedades lubrificantes do produto formado.

A produção de ésteres derivados de poliálcoois foi realizada por esterificação via catálise química com cloreto de estanho ou de alumina utilizando o ácido 10-undecenóico e NPG, TMP e PE obtendo rendimentos de 92 – 96% de conversão do substrato. Os produtos foram avaliados quanto as suas propriedades lubrificantes e foram encontrados os seguintes valores: viscosidade à 40 °C, 11,20–36,10 cSt; à 100 °C, 3,200–7,300 cSt; IV, 162–172; ponto

de fluidez, +3 à -36 °C; ponto de fulgor, 254–296 °C. Sendo que todos os ésteres apresentaram boas estabilidades térmicas e suas propriedades foram melhores do que os obtidos com o ácido oléico (PADMAJA et al., 2012).

A patente US005747434A descreve um procedimento que utiliza as lipases de *Candida rugosa* e *Mucor miehei* (Lipozyme TM) imobilizada para a produção de ésteres de trimetilol etano, TMP, trimetilol butano e PE. A produção por transesterificação enzimática com o biodiesel metílico de colza ocorreu para os ésteres de TMP e não para os de PE. As condições reacionais utilizadas foram: 4 g de biodiesel e 0,7 mL de água destilada. .As reações foram mantidas por 48 a 72 h em temperaturas de 42 a 58 °C sob vácuo obtendo conversões acima de 95% (MERJA LÄMSÄ et al., 1998).

A relação CENPES/LaBiM originou um pedido de depósito de patente (BR 102012 009727-3) com a inovação envolvendo a utilização da lipase de *Candida rugosa* em reações de síntese de biolubrificantes a partir dos biodieseis metílicos de mamona (ricinoleato de metila), de soja e de pinhão-manso. Foram estudadas as influências das variáveis de processo (tipo e concentração de enzima, teor de água, temperatura, concentração de biodiesel, tempo de reação) em reatores de vidro (50 mL), sob vácuo e temperatura controlada. Neste trabalho, foi verificado que a variável temperatura foi a mais influente gerando conversões superiores a 95%, em 24 horas a 45 °C, utilizando-se como matéria prima o ricinoleato de metila e como biocatalisador a lipase de *Candida rugosa*. O produto obtido da reação entre o biodiesel metílico de mamona e o TMP, catalisado pelas CRLs, apresentaram as seguintes propriedades lubrificantes e físico-químicas: viscosidade a 40 °C, 291,6 cSt; a 100 °C, 27,59 cSt; índice de viscosidade, 126; e RPVOT (*rotating pressure vessel oxidation test* - estabilidade oxidativa): 40 minutos, excelentes características que indicam a viabilidade dessa nova tecnologia para a produção de biolubrificantes.

Todos os poliolésteres, bem como ocorre com os óleos vegetais, funcionam como uma espinha dorsal, dando estrutura à molécula. Os ésteres derivados de poliálcoois têm sido recomendados para o uso em diversos campos de atuação como óleo de cárter, óleos de motores de 2 tempos, fluidos hidráulicos, de usinagem, de perfuração e de compressor, entre outros, sendo sugerida a avaliação prévia da estrutura e propriedades dos

poliolésteres para posterior escolha da aplicação (ALDRICH et al., 1998, WU et al., 2013; NAGENDRAMMA; KAUL, 2012).

3.9 Estolídeos

Muitos estudos vêm sendo realizados nos últimos anos devido a toda a contextualização ambiental de modo a referenciar uma grande variedade de óleos vegetais e derivados modificados quimicamente sendo um grande exemplo além dos poliolésteres, abordados no tópico 3.8, os estolídeos. Estes são produtos resultantes da polimerização de ácidos graxos, ésteres ou mesmo dos triacilgliceróis presentes nos óleos vegetais, que podem apresentar benefícios como óleos básicos para a produção de lubrificantes ou diretamente como lubrificantes, sem a necessidade de aditivos (CERMAK et al., 2013; CERMAK; ISBELL, 1990; GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013a; ISBELL et al., 2006).

Em sua forma natural os estolídeos podem ser encontrados em quantidades traço, na forma de estolídeos triglicídicos, em sementes de plantas da família Cruciferae ou Brassicaceae (famílias do repolho, couve-flor, nabo, agrião e da mostarda), nos gêneros Lesquerella e Heliophila, devido à presença de hidroxiácidos na composição de seus triglicerídios. O óleo de Cruciferae conta com a presença dos ácidos lesquerólico (ácido 14-hidroxi-cis-11-eicosanóico), densipólico (ácido 15- hidroxi-9,15-octadecadienóico) e auricólico (ácido 14-hidroxi-11,17-eicosadienóico). Especificamente, 96% ou mais do óleo de Lesquerella auriculata é naturalmente formado por estolídeos triglicéricos o que confere uma exceção (HAYES; KLEIMAN, 1995; ISBELL, 2011; PELAEZ et al., 2003).

Um dos primeiros registros da síntese de estolídeos de óleo de mamona data de 1954 no qual eram chamados de ésteres ricinólicos secundários (*secundary ricinolyl esters*). Neste trabalho, os autores sintetizaram estolídeos triglicéricos, a partir de óleo de mamona, de Lesquerella, e ácidos graxos, utilizando como catalizador NAOH e temperaturas elevadas (atingindo 204 °C), sendo o produto desta reação foi utilizado como óleo secante (PENOYER; VON FISHER; BOBALEK, 1954). Existem diversas formas de obtenção de moléculas de estolídeos, no entanto, as formas mais comuns envolvem a reação de esterificação entre a

carbonila funcional, presente no terminal carboxílico de um ácido graxo saturado ou não, e uma insaturação ou ainda uma hidroxila em outro ácido graxo, triacilglicerol ou éster qualquer como o biodiesel de mamona (AGUIEIRAS et al., 2011; BÓDALO et al., 2008; CERMAK et al., 2011, 2013; GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013b; ISBELL et al., 2006).

Assim, a estrutura denominada estolídeo é identificada pela presença de pelo menos uma ligação éster secundária entre uma molécula com a presença de um acil graxo à estrutura alquil de outro fragmento acil graxo. Essas reações levam à formação de estolídeos livres o que significa que possuem algum terminal passível de ser esterificado (CERMAK; ISBELL, 2009), conforme exemplo da Figura 14 que mostra uma molécula de estolídeo formada a partir do ácido ricinoléico.

Figura 14 Esquema representando um estolídeo livre de ácido ricinoléico no qual "n" pode assumir valores a partir de "0". As setas indicam o terminal carboxílico e a hidroxila livre por onde o estolídeo pode continuar o processo de polimerização.

Um dos critérios para se avaliar o tamanho do estolídeo é o número de estolídeo (NE), que é definido como o número de moléculas de ácidos graxos que foram adicionadas a um ácido graxo base, (NE = n+1), e representa a extensão da oligomerização (ISBELL, 2011). Se n=0 (Figura 14) teremos NE = 1, sendo assim encontradas moléculas de dímeros de ácidos graxos, o que classifica o estolídeo como monoestolídeo. A partir de trímeros (n=1 e NE=2), os estolídeos já são considerados como oligômeros e por isso são nomeados de poliestolídeos apesar de haver algumas denominações como diestolídeos para trímeros e assim por diante (HAYES; KLEIMAN, 1995).

Os estolídeos livres também podem ser convertidos em ésteres de estolídeos em um processo que é conhecido como reação de capeamento do estolídeos (*capping reactions*), no qual é realizada uma reação de esterificação em cada um dos terminais livres do

estolídeo com um álcool ou outro ácido graxo (saturado). Desse modo, a oligomerização é finalizada nesse ponto, uma vez que não há sítios para a introdução de novas moléculas de ácidos graxos e o estolídeo é denominado como capeado ou acabado (*capped estolide*) (CERMAK; ISBELL, 2003).

Entretanto, no caso de estolídeos de ácido ricinoléico, como no exemplo Figura 14, existem outros terminais possíveis para o ataque nucleofílico e estes sítios são a hidroxila livre do ácido graxo base e o terminal carboxílico do último ácido ricinoléico (indicados pelas setas). Caso apenas um destes terminais for esterificado o estolídeo passa a ser chamado de "estolídeo monoacabado" (mono-capped estolide) e quando os dois sítios estiverem esterificados o estolídeo passa a ser chamado também de "estolídeo acabado ou completo" (full estolide) (ISBELL et al., 2006).

A Figura 15 apresenta outro exemplo da formação de um estolídeo, no entanto, a partir do óleo de Lesquerella que contém de 55 - 60% do ácido lesquerólico (14-OH 20:1Δ11cis). Neste exemplo destaca-se a produção de uma molécula de estolídeo triglicídico – o que significa que foi formado a partir de um triglicerídeo, no caso o óleo de lesquerella – por meio da reação de esterificação entre o ácido láurico e os terminais livres hidroxílicos. Como se nota na Figura, também há dois possíveis sítios para a esterificação. Sendo assim, esta reação pode gerar a formação de um estolídeo monoacabado ou um estolídeo acabado.

Figura 15 Exemplo da formação de um estolídeo triglicídico a partir da reação de esterificação entre o óleo de Lesquerella e o ácido láurico (modificado de ISBELL et al., 2006).

A adição de um ácido graxo saturado como agente terminador (*end-capper*), pode diminuir o número de insaturações na molécula, melhorando sua estabilidade oxidativa. No entanto, os pontos de fluidez e de névoa são negativamente afetados o que diminui o desempenho do lubrificante em baixas temperaturas (CERMAK; ISBELL, 2002a). Mesmo assim, tal característica deve ser levada em consideração para muitas aplicações do estolídeo como lubrificantes, inclusive para ampliar o seu espectro de atuação. Logo, a escolha do material de capeamento é importante para se obter estolídeos com as propriedades requeridas (CERMAK e ISBELL, 2001).

Na literatura tem sido observado o grande potencial dos estolídeos derivados de ácidos graxos, como exemplo o ácido ricinoléico, devido aos seus altos IVs e biodegradabilidade, podendo ser empregados em aplicações específicas como plasticidas, aditivos em cosméticos, componentes de tintas, controladores de viscosidade em chocolates e emulsificantes em margarinas e como resinas de revestimento no processamento de metais (BÓDALO-SANTOYO et al., 2005; HAYES; KLEIMAN, 1995; PELAEZ et al., 2003; YOSHIDA et al., 1997). Ultimamente, devido as suas excelentes propriedades lubrificantes, estolídeos livres e acabados tem sido estudados como uma alternativa aos lubrificantes derivados de óleos minerais (CERMAK; ISBELL, 2002b).

Os estolídeos podem ser produzidos a partir de uma série de óleos vegetais como: de Lesquerella (comum nos Estados Unidos, pertencente a Brassicaceae), de mamona e de planta dos prados (*meadowfoam*) (ISBELL et al., 2006; ISBELL; CERMAK, 2004) e de ácidos graxos como: o ácido oléico e ácido petroselínico (isômero natural do ácido oléico – 18:1 Δ6cis), ácidos graxos do óleo de coco, ácidos graxos do óleo de *pennycress* (*Thalspi arvense*) e ácido ricinoléico (BÓDALO et al., 2009; CERMAK et al., 2013, 2015a, 2015b; GRECO-DUARTE et al., 2017).

De modo geral, os estolídeos apresentam excelente lubricidade, com baixos pontos de fluidez, boa estabilidade oxidativa e biodegradabilidade, e normalmente superam o desempenho de produtos disponíveis no mercado como fluidos derivados de óleo de soja e fluidos hidráulicos derivados de petróleo (CERMAK; ISBELL, 2003, 2009; ISBELL; CERMAK, 2004). Além disso, as ligações ésteres secundárias dos estolídeos são mais resistentes à hidrólise do que as ligações presentes nos triglicerídeos de óleos vegetais. Esse aspecto estrutural dos estolídeos origina propriedades superiores em baixas temperaturas, além das propriedades já inerentes da molécula de ácido graxo (ISBELL; EDGCOMB; LOWERY, 2001).

3.10 Síntese de estolídeos

Muitos trabalhos são encontrados referenciando a síntese de estolídeos. Entretanto, a grande maioria utilizam ácidos graxos puros (acima de 98%) o que encarece o processo ou

ainda produtos comerciais proveniente da hidrólise térmica/ química de óleos diversos, o que pode prejudicar as características principalmente relativas à estabilidade do produto final (GRECO-DUARTE et al., 2017). A maior parte dos estudos faz uso da catálise química, sendo a catálise ácida mais promissora. Todos os produtos já vistos produzidos por rota química possuem propriedades lubrificantes promissoras. Estes óleos podem ser empregados como base para a produção de um lubrificante acabado ou ainda como o próprio lubrificante sem a necessidade de aditivos, que são requeridos para melhorar as propriedades lubrificantes tornando-os aptos a determinada aplicação (CERMAK; ISBELL, 1990).

3.10.1 Catálise química

A rota mais empregada para a síntese de estolídeos é a partir de reações de polimerização do ácido oléico, ácido ricinoléico e ácido 12-hidroxiesteárico sob altas temperaturas ou utilizando catálise ácida (CERMAK; ISBELL, 1990, 2001; ISBELL; ABBOTT; LOHR JR., 1991; JÚNIOR et al., 2011) sendo o grupo com mais publicações na área pertencente ao "United States Department of Agriculture" (USDA) em Illinois (EUA). Mais recentemente foi empregado o uso de líquidos iônicos para catalisar a reação de esterificação do ácido ricinoléico (WANG; SUN, 2017).

Os processos de obtenção de estolídeos de alguns dos documentos já referenciados neste trabalho serão descritos a seguir. Nestes trabalhos, é possível notar que todos exigem várias etapas, requerem tempo (tempo mínimo de 24 h) e, além disso, estes estudos exigem a utilização de produtos perigosos (catalisadores ácidos como o ácido sulfúrico) à saúde humana e do ambiente.

O documento PI 0905200-3 (2011) apresenta o processo de obtenção de um biolubrificante a partir de um hidrolisado de óleo de mamona compreendendo três etapas principais sendo elas: 1) a esterificação do hidrolisado de mamona comercial com um monoálcool utilizando ácidos de Lewis como catalisadores; desta etapa os autores obtém um éster que será submetido à 2) reação de hidrogenação catalítica para redução da ligação dupla do C9-10; e, finalmente este produto é encaminhado para 3) reação de capeamento da hidroxila com anidridos de ácidos que consistem numa acilação catalisada por uma base

nitrogenada para a obtenção dos estolídeos acabados. A reação 1 e a 2 ocorrem concomitantemente em excesso de monoálcool e dura de 12-30 h numa faixa de temperatura que pode variar de 40-80 °C sob agitação constante enquanto a reação 3 é realizada após a retirada do excesso de álcool e ocorre em atmosfera inerte (nitrogênio ou Argônio) na faixa de temperatura entre 80 – 120 °C durante 12 -30 h. Após o ciclo completo, o produto deverá atingir a temperatura ambiente e ser lavado com solução ácida e de sais para a retirada do excesso de anidrido ácido e a base nitrogenada da fase orgânica (JÚNIOR et al., 2011).

Os autores ISBELL e colaboradores (1991) do grupo de pesquisa de Illinois (USDA) patentearam o processo de produção de um novo estolídeo com características lubrificantes a partir de ácido oléico e a posterior esterificação deste estolídeo com um álcool (US 6018063, 2000). Para isso foi utilizado ácido oléico comercial que foi submetido à reação de hidrogenação catalítica seguida da esterificação entre ácidos oléicos catalisadas por ácido sulfúrico que foi adicionado no tempo de 4 min. Esta reação foi conduzida a vácuo por 24 h à 300 rpm e 55 °C. Após este tempo, foi injetado nitrogênio para desfazer o vácuo e à reação foi adicionado um álcool, o vácuo e as mesmas condições reacionais foram reestabelecidas, e a nova reação foi conduzida por 2 h. Neste tempo, foi adicionada uma solução de fosfato dissódico em água contendo cerca da metade do volume reacional, sob agitação vigorosa. Após isso, a mistura foi deixada em repouso de um dia para o outro para a recuperação da fase aquosa e a retirada do álcool por destilação à vácuo a 100 °C.

Posteriormente, o mesmo grupo patenteou um trabalho, dando seguimento ao trabalho apresentado no parágrafo anterior, desta vez, com o uso de ácido perclórico à 60 °C e como matéria-prima foram adicionados, não somente ácido oléico, mas também ácidos graxos provenientes da hidrólise do óleo de coco e ácidos graxos livres como o láurico, mirístico, decanóico, octanóico e capróico, em diversas razões molares. Os produtos das reações foram: estolídeo livre, 2-etil-1-hexil estolídeos e produtos sem os monômeros de ácidos graxos livres, foram caracterizados quanto ao ponto de fluidez, viscosidade cinemática a 40 e 100 °C por meio dos quais é calculado o índice de viscosidade (IV), ponto de névoa e cor. A reação foi conduzida de forma bem semelhante à do documento US 6018063 (2000), sendo que ao final, o produto obtido também poderia passar por mais uma etapa de remoção para retirada dos monômeros de ácidos graxos ainda livres, que é feita na

temperatura de 180-190 °C em destilação a vácuo. O produto final, mesmo utilizando elevadas temperaturas, obteve características interessantes, podendo em alguns casos ser empregado sem a necessidade de alguns aditivos. O maior ponto de fluidez (3 °C) e o menor IV (122) foram encontrados para os estolídeos livres provenientes das reações entre ácidos oléico: esteárico (razão molar 2:1) e ácido oléico: capróico (2:1), respectivamente. O menor e melhor ponto de fluidez (-36 °C) foi encontrado no 2-etil-1-hexil estolídeo proveniente da reações entre os ácidos oléico: láurico (2:1) e por fim o maior IV (232) foi encontrado no produto após a remoção dos monômeros livres na reação entre ácido oléico: ácidos graxos de óleo de coco (3:1).

Os autores GARCÍA-ZAPATEIRO et al., (2013b) estudaram as propriedades tribológicas, térmicas e a viscosidade de uma variedade de estolídeos livres obtidos do ácido oléico e ricinoléico e suas misturas com óleos vegetais (óleos de girassol, que contém teores elevados de ácido oléico, e óleo de mamona) produzidos por diferentes protocolos de síntese química com catalisadores ácidos. Os autores observaram que o grau de polimerização foi afetado de acordo com o protocolo utilizado sendo o maior encontrado com o uso do ácido sulfúrico. Foram produzidos estolídeos com massa molares de 4,4 a 6,9 vezes maiores que os ácidos graxos utilizados como reagentes.

3.10.2 Catálise enzimática

Como visto no tópico 3.10.1, a maior parte dos trabalhos relacionados à síntese de estolídeos utiliza catalisadores ácidos como ácido sulfúrico e ácido perclórico, e/ou altas temperaturas (200 °C) e pressões. Entretanto, além dos relacionados à geração de efluentes ácidos e corrosão proveniente dos resíduos ácidos, a síntese de estolídeos pelo processo químico apresenta problemas relacionados à coloração e odor do produto final, devido às altas temperaturas empregadas (BÓDALO-SANTOYO et al., 2005; BÓDALO et al., 2009).

Além disso, a utilização de ácidos fortes como o ácido sulfúrico também pode conduzir a quebra de grupos funcionais presentes nos estolídeos e a formação de subprodutos que se decompõem ao longo do tempo, liberando grupamentos ácidos sulfonados que diminuem o pH da solução de estolídeos, prejudicando o funcionamento do fluido (CERMAK; ISBELL, 2001; HAYES; KLEIMAN, 1995).

O uso de biocatalisadores vem então representando uma alternativa interessante para a obtenção de estolídeos em relação aos métodos químicos convencionais. Além disso, como os métodos enzimáticos são bem específicos, quase nenhum coproduto reacional será formado, o que reduz a quantidade de efluentes industriais gerados. Além disso, o emprego de biocatalisadores reduz o consumo de energia do processo, pelo fato das lipases atuarem em condições reacionais brandas de temperatura, pH e pressão (LAGUERRE et al., 2017).

O estado da arte com relação à produção de estolídeos por via enzimática não apresenta tanta representatividade. No entanto é possível encontrar estudos utilizando principalmente as lipases comerciais de *Candida rugosa* (BÓDALO-SANTOYO et al., 2005; BÓDALO et al., 2008, 2009; YOSHIDA, YASUKO; MITSUO, KAWASE; CHOZO, 1993; YOSHIDA et al., 1997). Duas patentes japonesas mencionam o uso de lipases para a produção de estolídeos a partir de hidroxiácidos, particularmente o AR. O documento JP213387 (1990) expressa os estolídeos produzidos por número de iodo (*iodine value*) e JPH05211878 (1993) tratam da produção enzimática utilizando lipases imobilizadas na concentração de 800 mg/g de substrato, com controle de retirada de água durante a reação usando ácidos graxos livres de mamona comerciais, mas não menciona relatos quanto às propriedades dos lubrificantes obtidos.

Em 1995, HAYES & KLEIMAN testaram oito lipases quanto à sua capacidade de sintetizar estolídeos a partir de uma mistura que continha ácido lesquerólico e oléico. Com exceção da lipase de *Aspergitlus niger*, todas as enzimas 1,3 -específicas - lipases de *Rhizopus arrhizus* e *Rhizomucor miehei* - não foram capazes de sintetizar os estolídeos. As lipases não-específicas de *Candida rugosa* e *Geotrichum candidum* catalisaram a formação de estolídeo com> 40% de rendimento, com > 80% de monoestolídeos formados por um grupo acil lesquerólico e um oléico. A lipase, também não específica de *Pseudomonas* sp., sintetizou estolídeos com 62% de rendimento sendo a mistura do produto composta principalmente por monoestolídeos e diestolídeos compostos de ácido lesquerólicos.

Recentemente, TODEA et al., (2015) fizeram o estudo conjunto da varredura de diversas lipases comerciais para testar, não somente a produção de estolídeos mas também a seletividade de diversas lipases comerciais frente aos substratos utilizados, entre as lipases utilizdas estão: *C. rugosa, Aspergillus oryzae, Candida antarctica* A, *Rhizopus arrhizus, C. antarctica* B, *P. fluorescens* e de pâncreas de porco. Foram utilizados dois tipos de

hidroxiácidos comerciais saturados (C16 16OH, C18 12OH) e um insaturado – ácido ricinoléico (C18:1 Δ9cis 12-OH) para comparar a seletividade das enzimas frente aos diferentes substratos e a catálise foi realizada em meio orgânico composto por tolueno. Todas as reações foram conduzidas pelo tempo de 24 h, na temperatura de 40 °C e os produtos foram avaliados. Os autores encontraram resultados com maiores conversões dos ácidos graxos livres (91,6 %) utilizando o ácido-16-hidroxi-hexadecanóico obtendo dímeros, trímeros e tetrâmeros utilizando as enzimas *C. antarctica* B e de pâncreas de porco. Além disto, utilizando o ácido ricinoléico, os autores obtiveram no máximo 33,2% de conversão para a as enzimas *C. antarctica* B, sendo o maior produto encontrado nesta reação os dímeros. Utilizando a enzima *P. fluorescens* formou-se até trímeros com 31,5 % de conversão. A enzima de *Candida rugosa*, entretanto, não apresentou boa conversão.

3.11 Principais propriedades dos lubrificantes

3.11.1 Propriedades químicas

3.11.1.1 Biodegradabilidade

O derramamento de 1 litro de óleo mineral é capaz de contaminar 1 milhão de litros de água potável que ficará impróprio para uso (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; JÚNIOR et al., 2011). Além da contaminação, a sua toxicidade e formação de filme sobre os corpos fluviais tende a impedir a sobrevivência da fauna local tornando inviável qualquer tipo de degradação.

Deste modo, nos últimos anos, a produção de lubrificantes tem sido direcionada para produtos obtidos de fontes renováveis e biodegradáveis. A definição do termo biodegradabilidade pela ASTM (*American Society for Testing and Materials*) demorou alguns anos até se chegar a um consenso, o que levou a atrasos no desenvolvimento de padrões e de biolubrificantes na década de 90, na época por influência da tendência europeia (SILVA, 2012). Este conceito tem se destacado dentro dos parâmetros para a seleção de óleos básicos e para a formulação de óleos acabados, no que diz respeito à adição de aditivos (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; FOX; STACHOWIAK, 2007; KANIA et al.,

2015; MADANHIRE; MBOHWA, 2016; MCNUTT; HE, 2016; NAGENDRAMMA; KAUL, 2012). O ensaio padrão utilizado no Brasil para determinação da biodegradabilidade de compostos de acordo com o *Coordinating European Council* é o CEC L-33-A-93 (antigo CEC L-33-A-82) e por meio dele chega-se ao valor de 15 – 35% de biodegradabilidade para os óleos minerais.

De uma forma geral, os lubrificantes biodegradáveis são aqueles passíveis de serem convertidos, por micro-organismos, em compostos de massa molar menor que a original que não detém toxicidade e, portanto, não representam ameaças ao ambiente. A estrutura química dos lubrificantes / aditivos utilizados está diretamente relacionada à sua taxa de biodegradação e afetam as suas propriedades, que por vezes afetam o desempenho nos vários ensaios padrão de biodegradabilidade. A solubilidade em água, por exemplo, é crítica em alguns testes de biodegradabilidade porque quanto menor a solubilidade em água, mais difícil o seu acesso pela microbiota. A toxicidade, por sua vez, é muito importante, pois se o lubrificante é tóxico e reduz a população de organismos, então isto deverá afetar negativamente o processo de biodegradação (RUDNICK, 2006).

A biodegradabilidade pode ser classificada por quatro testes de acordo com o material e sua susceptibilidade ao ataque por micro-organismos aeróbicos ou anaeróbicos: biodegradabilidade primária (relativa), final, inerente ou pronta (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; SILVA, 2012).

Produtos ditos como prontamente biodegradáveis são aqueles que passaram pelos testes de triagem da biodegradabilidade final. Estes testes são tão rigorosos que se assume que estes compostos irão se decompor rápida e completamente em ambientes aquáticos sob condições aeróbicas. Normalmente, isso implica que 60% ou mais do material submetido ao teste de biodegradabilidade foi convertido à CO₂, em 28 dias. Mais de 95% dos óleos básicos usados na fabricação de lubrificantes não atendem ao critério de serem prontamente biodegradéveis. Sendo assim, estes materiais podem ser submetidos a testes de biodegradabilidade inerente, que são utilizados para avaliar se uma substância tem algum potencial para biodegradação. A maior parte dos biolubrificantes hidráulicos são produtos prontamente biodegradáveis.

Produtos inerentemente biodegradáveis são químicos que claramente terão algum tipo de biodegradação em qualquer teste de biodegradabilidade (seja ela primária ou final). Este teste é utilizado também para avaliar se a substância tem algum tipo de potencial para

biodegradação. Os óleos minerais brancos e lubrificantes de grau alimentício são geralmente produtos inerentemente biodegradáveis, uma vez que levam mais tempo para serem consumidos no meio ambiente do que óleos vegetais e, além disto, são considerados como produtos.

Biodegradabilidade final (*Ultimate biodegradation*) é o nível de degradação alcançado quando o composto de teste é totalmente convertido (100% biodegradado), por micro-organismos, resultando na produção de CO₂, CH₄, H₂O, sais minerais e novos constituintes celulares microbianos (biomassa). Óleos vegetais, em geral, são "finalmente" biodegradáveis. Existe também uma linha de produtos lubrificantes, de base biológica, da *United Bio Lube*, que é classificada como "finalmente" biodegradável, pela classificação mais elevada da USDA. A maior parte dos produtos de base biológica, por serem feitos a partir de fontes renováveis, será classificada como prontamente biodegradável. No caso dos óleos vegetais a biodegradabilidade é de 99% e, usualmente, cai para 90 a 98% com a inclusão de aditivos. Por outro lado, a biodegradabilidade dos óleos minerais é de apenas 20% (MAKKONEN, 1994).

A biodegradabilidade primária de um lubrificante é medida, tipicamente, pelo método CEC-L-33-A-93 e corresponde à alteração na estrutura química de uma substância por micro-organismos, resultando na modificação de alguma propriedade da mesma. Na Tabela 4 podem ser observados alguns óleos básicos e seus percentuiais de biodegradabilidade primária.

Tabela 4 Biodegradabilidade primária de óleos básicos medida pelo método CEC-L-33-A-93 (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

Tipo de óleo	Biodegradabilidade primária (%)
Óleo mineral	15-35
Óleo mineral branco	25-45
Alquilbenzeno	5-20
PAO	5-30
Poli-isobutileno	0-25
Poliéster	0-25
Poliolésteres e di-ésteres	55-100
Óleos vegetais e naturais	70-100

3.11.1.2 Estabilidade termo-oxidativa

Para um produto ser oxidativamente estável significa ter a habilidade de manter suas propriedades se exposto a condições operacionais específicas (HONARY; RICHTER, 2011). Os óleos vegetais têm melhor desempenho em termos de evaporação e toxicidade, entretanto tem pior desempenhono quesito desempenho em alta temperatura e tempo de prateleira. A razão reside na sua estrutura molecular, em particular no grupo β-CH central na porção glicerol e nas ligações duplas nas cadeias graxas. A estabilidade oxidativa de um óleo vegetal depende então de sua estrutura que determina as propriedades do lubrificante e as estabilidades operacionais, das condições utilizadas para a sua extração, da presença de contaminantes (particularmente traços de metais, água, radicais e peróxidos), antioxidantes naturais e condições de armazenamento. O uso direto de óleos vegetais puros bem como os próprios biolubrificantes enfrentam problemas em condições de temperatura elevada, pois, nestas condições são submetidos à oxidação degradativa. A maioria dos biolubrificantes têm uma temperatura operacional máxima de 70 °C, podendo atingir 120 °C em formulações. O conhecimento das propriedades oxidativas dos lubrificantes é necessário para prever a estabilidade térmica em longo prazo destes fluidos, que é uma propriedade lubrificante criticamente importante. De modo geral, a ligação éster leva à instabilidade hidrolítica, as insaturações tornam o material mais susceptível à rápida oxidação que conduz a um aumento em viscosidade, elevado IAT (índice de acidez total) e corrosão. Por outro lado, as duplas ligações são necessárias uma vez que a presença de uma longa cadeia saturada resulta em baixo desempenho a frio (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013b; SILVA, 2012). Quanto mais resistente for um lubrificante à oxidação, menor será a tendência de formar depósitos, lodo e subprodutos corrosivos em aplicações de graxa, óleo de motor e óleo industrial (CERMAK; ISBELL, 2003).

Aditivos e misturas são freqüentemente usados para melhorar a estabilidade oxidativa de um óleo vegetal, o que leva à perdas na biodegradabilidade e aumento na toxicidade. Os antioxidantes naturais, tais como tocoferóis, caroteno, lecitina e gossipol, estão presentes naturalmente nos óleos vegetais, que também são passiveis de sofrer oxidação. Os antioxidantes evitam ou reduzem a formação de radicais livres, promovendo reações de terminação e, também, atuam na formação de uma película sobre a superfície

metálica, evitando assim o contato da mesma com o óleo. Muitos antioxidantes sintéticos têm sido desenvolvidos e testados em óleos vegetais, como, por exemplo, produtos fenólicos e aminas. O produto mais conhecido, BHT (2,6-di-tert- butil-1-4-metilfenol) é efetivo em ésteres e óleos vegetais e tem a vantagem de ser aprovado pelo US *Food and drug administration* (FDA) como um produto GRAS (*generally recognized as safe*), sendo utilizado como antioxidante para produtos alimentícios. Além do BHT, outros produtos fenólicos também são conhecidos. ISBELL (2011) constatou que a adição do BHT em conjunto com ADA (difenilamina alquilada) na proporção 1:1 totaltizando 1% do volume total do estolídeo acabado (2 Etil-1-hexil- coco-oleico estolídeo) o qual aumentou de 17 para 251 minutos de estabilidade oxidativa medido por RPVOT. Normalmente, lubrificantes acabados para cárter apresentam estabilidade oxidativa de 240 min medida em RPVOT (ASTM D 2272).

Existem vários métodos disponíveis para realização dos testes de estabilidade oxidaiva como: Índice de estabilidade oxidativa (OSI) - *oxidative stability index*, teste de oxidação por bomba rotatória (RPVOT) – *rotating pressure vessel oxidation test*, estimação de peróxidos, método do oxigênio ativo e o método Rancimat (CERMAK; ISBELL, 2003; SILVA, 2012).

Muitos óleos vegetais têm sua estabilidade oxidativa medida com o OSI, que é um teste de oxidação mais brando do que o RPVOT. A indústria geralmente dita o método ou instrumento a ser usado para um teste específico. Óleos vegetais são principalmente utilizados pela indústria alimentícia, então, a maior parte dos métodos de determinação da estabilidade oxidativa foram criados por esta indústria e, da mesma forma, pela indústria química. Os métodos para estabilidade oxidativa utilizados pela indústria de lubrificantes são baseados em óleos derivados do petróleo (óleos minerais) e, em geral, não são adequados aos óleos vegetais. Assim, a maioria das aplicações de alimentos requer o uso do OSI e não a RPVOT. Embora a indústria do petróleo exija um teste com condições muito mais severas do que a indústria alimentícia, devido ao ambiente em que são usados, a RPVOT é um dos testes recomendados (CERMAK; ISBELL, 2003; SILVA, 2012).

Outros métodos convencionais para melhorar a estabilidade oxidativa dos óleos vegetais são a hidrogenação dos ácidos graxos. A estrutura de óleos altamente

monoinsaturados também pode ser modificada quimicamente para melhorar as propriedades funcionais do óleo. AKOH (1994) comparou a estabilidade oxidativa por OSI entre o óleo de soja refinado e o produto de sua parcial hidrogenação, respectivamente, encontrando 9,4 h e 15,3h a 110 °C comprovando que há uma melhoria ao se hidrogenarem as duplas ligações, no caso, de mais de 60%. A mesma abordagem foi adotada com os estolídeos provenientes do ácido oléico, que foram submetidos a hidrogenação com 2% m/m de 10% de paládio em carvão ativado para obtenção de estolídeos completamente saturados Tendo-se em vista os resultados obtidos por AKOH (1994), se esperava que a hidrogenação dos estolídeos provenientes do ácido oléico seguissem a mesma tendência apresentada pelo óleo de soja, se mostrando mais estáveis na forma saturada do que os estolídeos insaturados. No entanto, o produto final tinha baixíssimo desempenho à baixa temperatura, o que o tornou inútil para as aplicações desejadas (ISBELL; EDGCOMB; LOWERY, 2001).

A oxidação de compostos graxos insaturados ocorre em diferentes taxas, dependendo não somente do número, como também da posição das ligações duplas conforme foi observado no estudo da estabilidade oxidativa em relação à posição olefínica de ésteres metílicos graxos monoenóicos (ISBELL; ABBOTT; CARLSON, 1999). Os autores demonstraram que a ligação dupla $\Delta 5$ é a mais estável, em mais de uma ordem de grandeza, e determina um valor OSI excepcionalmente alto em comparação com a $\Delta 6$, $\Delta 9$ e $\Delta 13$. No caso de ácidos poli-insaturados, a ocorrência de posições bisalílicas (Figura 16) são ainda mais propensas à oxidação do que as posições alílicas. As taxas relativas de oxidação são demonstradas na Figura 16.

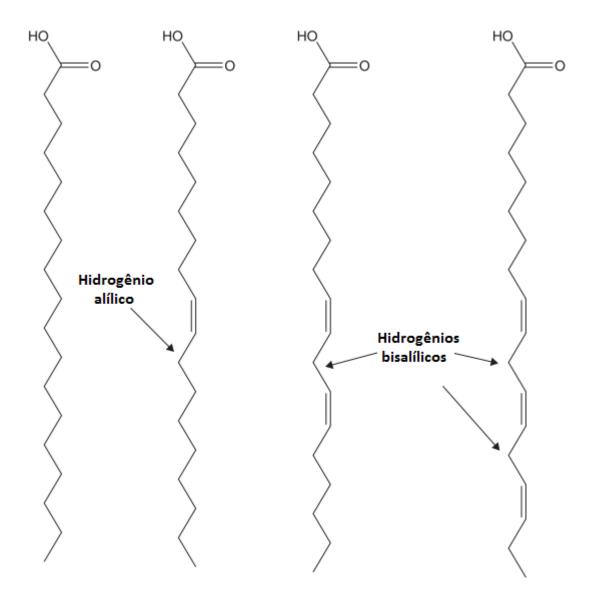


Figura 16 Comparação entre a oxidação relativa de ácidos graxos com o mesmo número de carbonos (C18) variando a quantidade de duplas ligações e, portanto, a presença de hidrogênios alílicos. Da esquerda para a direita taxa de oxidação relativa: estearatos: oleatos: linoleatos: linolenatos = 1: 10: 100: 200.

O ataque oxidativo aos ácidos graxos insaturados começa pela transferência de um elétron e formação de radicais livres (iniciação). Este intermediário radical reage com o oxigênio molecular em uma reação em cadeia formando os hidroperóxidos pelo que é designado de propagação (Figura 17). Os hidroperóxidos resultantes são ainda degradados com a produção de pequenas moléculas (água, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos) e produtos de condensação, que aumentam a viscosidade e podem até formar sedimentos por policondensação (terminação). A degradação resulta em fragmentos voláteis

de baixo peso molecular e produtos de degradação que prejudicam as propriedades lubrificantes. A concentração de oxigênio também tem um efeito direto na taxa de formação de hidroperóxido (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; SILVA, 2012).

Figura 17 Exemplo de ataque oxidativo ao hidrogênio bisalílico presentes nos ácidos graxos com duplas conjugadas.

A oxidação pode incluir também reações de polimerização entre triglicerídeos por meio de reações de átomos próximos à insaturação, o que pode formar material de massa molar mais elevada e insolúveis que venham a se depositar como "lamas". O átomo de hidrogênio-β dos triglicerídeos também é facilmente eliminado da estrutura molecular através da oxidação o que leva ao enfraquecimento da ligação éster no centro da molécula, que irá quebrar apenas pelo calor, criando um ácido carboxílico e uma porção glicerol promovendo, assim, uma degradação adicional do óleo. A extensão da oxidação e formação de produtos de oxidação é influenciada pela presença de antioxidantes e metais.

A umidade também exerce influência nas reações de oxidação (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013b). Em um nível de atividade de água de 0,5 ± 0,2 (um teor de água de aproximadamente 50% da solubilidade de saturação), a água tende a estabilizar os hidroperóxidos e facilitar as reações de terminação dos radicais livres. Em níveis inferiores, esta "hidroproteção" é negligenciável, conduzindo a altas taxas de oxidação. Já em níveis mais elevados, ocorre o risco de formação de ácidos graxos livres (os quais oxidam mais rápido do que os glicerídeos). Ácidos carboxílicos livres gerados a partir da oxidação de um triglicerídeo tornam o lubrificante ácido promovendo a corrosão. Além disto, estes

grupos ácidos têm atração por metais oxidados que poderão ser removidos e solubilizados pelo óleo a partir de algumas superfícies de partes metálicas lubrificadas. As taxas de oxidação tendem a serem maiores em teores de umidade próximos ou superiores à saturação.

Outro fator que acelera a oxidação é a radiação, incluindo a luz solar e a artificial. A luz promove a formação de radicais livres, influenciando a oxidação. A foto-oxidação ocorre por um mecanismo diferente envolvendo oxigênio singleto em taxas 1000 ou mais vezes mais rápidas do que sem a radiação (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013b)

Ésteres de ácidos graxos com grupamentos no carbono 12, como, por exemplo, o éster 12-acetilricinoleato de metila (derivado do óleo de mamona), apresentam melhores estabilidades oxidativas (YAO et al, 2010). Isto ocorre em função do impedimento estérico imposto pelo grupamento, o qual está situado no carbono alílico, adjacente à dupla ligação. Desta maneira, torna-se mais difícil a eliminação dos hidrogênios adjacentes a esta dupla ligação.

3.11.1.3 Estabilidade hidrolítica

A estabilidade hidrolítica pode ser medida por meio do índice de acidez total (IAT). O IAT baixo dos óleos vegetais quimicamente modificados (CMVOs) contribui para sua boa estabilidade química e térmica. Em termos de estabilidade hidrolítica, os óleos minerais são superiores aos óleos vegetais e seus derivados. A presença da ligação éster torna os CMVOs mais susceptíveis à hidrólise quando expostos a atmosferas úmidas, ou quando em contato com água. A resistência à hidrólise depende do tipo de álcool no éster (se o produto é transesterificado), do tamanho das ramificações acila nas cadeias de ácidos graxos, da geometria molecular, dos aditivos empregados e das condições de operação. Grupos acila lineares são mais susceptíveis à hidrólise do que grupos acila ramificados. Os parâmetros de processo (acidez, grau de esterificação, remoção de resíduos de catalisador e agente neutralizante) dos CMVOs também apresentam um importante impacto em sua estabilidade

hidrolítica. Uma baixa acidez, um alto grau de esterificação e um baixo nível de resíduos de processo aumentam a estabilidade hidrolítica dos CMVOs (RUDNICK, 2006).

3.11.1.3.1 Índice de acidez total

A acidez de um óleo geralmente é expressa em termos de índice de acidez total (quantidade de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os componentes ácidos presentes em 1g de óleo). O ponto de neutralização da amostra é detectado pela mudança de sua coloração (método colorimétrico ASTM D974), pela leitura do pH (método eletrométrico ASTM D664) ou ainda a análise pode ser realizada pelo método oficial AOCS Cd 3d-63 (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

Óleos e gorduras comerciais contêm sempre quantidades de ácidos graxos livres e impurezas, sendo o índice de acidez utilizado no controle da qualidade de fabricação uma vez que este deve ser bem baixo. O índice de acidez total de óleos vegetais de boa qualidade é inferior a 10 mg KOH / g e, normalmente, é encontrado de 20 a 25 mg KOH / g para óleos de qualidade inferior. Mesmo dentro da mesma safra de sementes, a acidez pode variar também em relação à extração e ao armazenamento de óleo (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

Já os óleos vegetais e gorduras usados contêm frequentemente mais de 3% em massa de ácidos graxos livres e esse aumento da acidez ocorre devido à contaminação externa ou processo de oxidação acelerado. Assim, o índice de acidez total de uma amostra de óleo é indicativo da qualidade do fluido e pode ser usado para determinar quando o óleo deve ser trocado. Para a aplicação como lubrificantes, são desejáveis valores inferiores a 0,5 mg KOH/g, uma vez que valores elevados de acidez contribuem para aumentar efeitos de corrosão (SILVA, 2012; BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

3.11.2 Propriedades físicas

3.11.2.1 Propriedades a baixas temperaturas

Um dos requisitos que é fundamental a um óleo lubrificante é que ele permaneça líquido em uma ampla faixa de temperatura. O ponto de fluidez é a temperatura mais baixa registrada na qual um óleo ainda é fluido e é a propriedade mais importante para se avaliar o comportamento dos óleos lubrificantes à baixas temperaturas, tanto que por muito tempo este parâmetro foi o único utilizado. Hoje em dia também é utilizado, por exemplo, o ponto de névoa que corresponde a temperatura na qual compostos dissolvidos no óleo, tais como parafinas começam a cristalizar. O ponto de fluidez é uma propriedade especialmente crucial para óleos que devem fluir a baixas temperaturas, tais como óleos hidráulicos de baixa temperatura, óleos de refrigeração, óleos de processamento de borracha e óleos de usinagem (refrigerantes), além de graxas e fluidos de perfuração. O ponto de fluidez deve ser pelo menos 10 °C abaixo da temperatura mais baixa prevista no ambiente no qual o lubrificante será usado (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; KANIA et al., 2015; SILVA, 2012).

Basicamente, o ensaio para determinação o ponto de fluidez consiste no aquecimento preliminar, seguido do resfriamento a uma velocidade especificada e observada em intervalos de 3 °C para avaliar as características do escoamento sendo a menor temperatura na qual o óleo ainda se movimenta o ponto de fluidez. Quanto mais baixo, melhor o óleo básico, sendo dado destaque aos valores inferiores a –36°C (SILVA, 2012). Os óleos vegetais apresentam tipicamente pontos de fluidez de -10 a -20 °C e solidificam em -15 °C, quando permanecem por longos períodos a baixas temperaturas. Já os poliolésteres, como os obtidos da reação entre o ácido oléico e TMP (TMP-oleatos), têm pontos de fluidez de -20 a -45 °C, o que é considerada uma faixa interessante, uma vez que engloba a maior parte das aplicações lubrificantes (ISBELL; EDGCOMB; LOWERY, 2001; SILVA, 2012). Assim, são necessárias modificações químicas com o objetivo de melhorar esta propriedade.

SALIMON; SALIH, 2010 e SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2012a promoveram modificações na estrutura do ácido ricinoléico e do ácido oléico, respectivamente, buscando avaliar as variações no ponto de fluidez e na estabilidade oxidativa. Eles observaram que o aumento do comprimento da cadeia do éster de cadeia média influenciou positivamente as propriedades a baixa temperatura dos diésteres produzidos, pois eles criaram uma barreira estérica ao redor das moléculas individuais inibindo a cristalização. Os resultados indicaram o ponto de fluidez mais baixo (-48 °C) para o etil-hexil 9- (octanoiloxi) -10- (behenoxi) octadecanoato com éster intermediário de cadeia behênica (C22) (SALIMON; SALIH; YOUSIF, 2012a). O ethilhexil 10,12-dihidroxi-9-behênoxiestearato apresentou o ponto de fluidez mais baixo dentre os derivados do ácido ricinoléico (-42 °C) (SALIMON; SALIH; 2010).

As ligações hidrogênio são um parâmetro crítico que influencia as propriedades de baixa temperatura de ésteres sintéticos. Desta forma, aumentar a quantidade de ligações de hidrogênio aumenta a interação intermolecular, o que, por sua vez, aumenta o volume estérico devido à formação de dímeros, trímeros ou até moléculas maiores, fracamente associadas, o que conduz a um ponto de fluidez baixo. A remoção destas ligações hidrogênio pela esterificação pode levar a diminuição ou ao aumento do ponto de fluidez de acordo com o tamanho e a natureza do terminador. Segundo ISBELL (2006), se tratando de agentes de capeamento saturados, quanto maior a cadeia carbônica (C18:0 e C20:0) mais fácil será o empilhamento entre as moléculas o que conduzirá a um ponto de fluidez maior do que o óleo de origem. No entanto, se a cadeia for menor (C2:0 < C:16) elas parecem interromper o empilhamento das moléculas produzindo pontos de fluidez menores do que os óleos originais. Bem como, a presença de duplas ligações no terminador diminui o ponto de fluidez pois modifica o arranjo estérico da molécula diminuindo sua compactação.

Já foi demonstrado que a irradiação com micro-ondas, IM, e os tratamentos térmicos tais como o "aquecimento corporal", AC (*heat-bodying*), produzidos a 280 °C e pressurizados a vácuo, afetam não somente a estrutura, mas também as propriedades térmicas e a lubricidade do óleo de soja, OS (BISWAS et al., 2007). Os óleos provenientes tanto de AC quanto de IM formaram uma estrutura de anel cíclico com polimerização fato que aumentou a viscosidade. O ponto de fluidez diminuiu de -9 °C (OS) para -15 °C (AC-OS) e -18 °C (IM-OS), e manteve altas viscosidades. Entretanto, o óleo IM, apesar do baixo ponto de fluidez,

mostrou um potencial reduzido como lubrificante, possivelmente devido a polimerização por micro-ondas.

Os óleos termicamente polimerizados (óleos termo-encorpados ou compostos) são produzidos principalmente a partir de óleo de linhaça refinado e óleos de soja ou óleo de tungue a 280 °C e alto vácuo.

A posição e a presença de ramificações também é um fator relevante para o ponto de fluidez. A presença de ramificações no centro da cadeia diminui mais o ponto de fluidez do que ramificações nas extremidades da mesma. As ramificações diminuem a simetria interna da molécula, resultando em um decréscimo do ponto de fluidez. O ponto de fluidez também diminui com o aumento da quantidade de duplas ligações na molécula. Tais fatores diminuem o ponto de fluidez pelo mesmo motivo que é a diminuição da compactação das moléculas de óleo vegetal (RUDNICK, 2006; SILVA, 2012). Sendo assim toda modificação que leve a um aumento das ramificações da molécula irão beneficiar as propriedades à baixas temperaturas uma vez que impedem o empilhamento das moléculas e portanto o óleo permanece fluido mesmo em temperaturas baixas.

3.11.2.2 Viscosidade

A viscosidade é a propriedades físicas mais importantes de qualquer lubrificante, pois está ligada diretamente às propriedades tribológicas do fluido. Devido à viscosidade do fluido, ocorre a formação de um filme protetor às superfícies metálicas que diminui os desgastes e o ataque sofrido pela fricção independentemente da sua natureza (mineral, sintética ou vegetal) e aplicação final. De uma forma simples, a viscosidade de um fluido corresponde a sua resistência ao escoamento, que é função da força necessária para haver deslizamento entre suas moléculas. Para os biolubrificantes não há um valor pré-definido, entretanto, por razões de mercado, a faixa de 8 a 15 cSt a 100°C é a que encontra um maior número de aplicações (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013c; SILVA, 2012). Uma das principais desvantagens dos óleos vegetais a serem usados como lubrificantes biodegradáveis é a faixa estreita de viscosidade disponível, em

contraste com uma grande variedade de lubrificantes minerais ou sintéticos encontrados no mercado, cobrindo uma ampla gama de viscosidades, o que favorece a sua utilização em muitas aplicações diferentes (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

Dois fatores que afetam a viscosidade são a presença de ligações de hidrogênio pelos grupos hidroxila e a estrutura tridimensional formada pelas ramificações estéricas das moléculas. A presença de uma hidroxila livre favorece interações intermoleculares entre os estolídeos criando dímeros fracamente associados, trímeros, etc., o que expande a estrutura estérica da solução aumentando assim a viscosidade do óleo. Desta forma, aos estolídeos acabados têm viscosidades menoresquando comparados aos estolídeos monoacabados, independente do comprimento da cadeia, devido à diminuição do volume estérico das moléculas. A esterificação da hidroxila reduz ou elimina a ligação de hidrogênio e consequentemente reduz a viscosidade do óleo (ISBELL et al., 2006).

No caso da obtenção de biolubrificantes por transesterificação, a viscosidade aumenta com o tamanho da cadeia do álcool (ERHAN; PEREZ, 2002).

GARCÍA-ZAPATEIRO et al., (2013b) chegaram à conclusão que os estolídeos livres obtidos a partir do ácido ricinoléico por catálise ácida apresentaram melhores propriedades à baixa temperatura e viscosidade muito mais elevada do que aqueles preparados a partir do ácido oléico. Em geral, as viscosidades dos produtos obtidos foram relacionadas a sua massa molar o que está de acordo com outros trabalhos como os de ERHAN e PEREZ (2002) e ISBELL e colaboradores (2006). Este último concluiu que o aumento da viscosidade de um óleo está correlacionado com o aumento do comprimento da cadeia carbônica, seguindo uma relação linear.

A viscosidade também aumenta com a mistura dos estolídeos provenientes do ácido oléico e ricinoléico com seus respectivos óleos: de semente de girassol (com altos teores de ácido oléico) e óleo de mamona. Tal fato indica que os óleos vegetais podem bem ser utilizados como um aditivo para aumentar a viscosidade dos lubrificantes sendo o destaque os obtidos com estolídeos preparados a partir do ácido ricinoléico. No entanto, esta mistura com seus respectivos óleos não alterou as suas propriedades tribológicas (GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013b).

Reações como oxidação e polimerização ou oligomerização, como no caso dos estolídeos, possibilitam a produção de lubrificantes com uma faixa de viscosidades bem ampla (10 a 10000 cSt a 40°C).

Quando se encontram no produto grupos acila isolados as ramificações resultam em uma diminuição da viscosidade (SILVA, 2012), no entanto, da mesma forma que ocorre no caso de interações fracas entre as moléculas de estolídeos, a viscosidade aumenta se ocorrem ligações cruzadas entre estes grupos acil ramificados que podem ocorrer via ligações sulfeto, carbono ou éter.

3.11.2.2.1 Índice de viscosidade

O índice de viscosidade (IV) é determinado por meio de cálculos, que são descritos no método ASTM D2270, correspondendo a um número adimensional que é utilizado para caracterizar a variação da viscosidade cinemática de um produto de acordo com a temperatura. O cálculo para a determinação do IV leva em consideração os valores medidos das viscosidades do produto a 40 °C e a 100 °C. Desta forma, quanto maior o IV, menor será a variação da viscosidade de um produto com o aumento da temperatura e vice-versa (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a). Os triglicerídeos, em geral possuem duplas ligações e linearidade espacial, o que os permite manter fortes interações intermoleculares com o aumento da temperatura quando comparados a hidrocarbonetos ou ésteres mais ramificados. Estes fatores conferem maiores IVs aos óleos vegetais do que os óleos de base mineral (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013b; MOBARAK et al., 2014)

Os óleos vegetais quimicamente modificados (CMVO's) assim como os óleos vegetais refinados, possuem IVs superiores aos óleos minerais os torna mais favoráveis para aplicações quando o IV se aproxima de 200. O IV diminui com a introdução de ramificações e grupos cíclicos em CMVO's (ERHAN et al, 2002). O IV também está, relacionado com a estabilidade oxidativa e reflete tanto a propensão de um óleo ou gordura para oxidar e polimerizar quanto para formar depósitos no motor. No entanto, uma relação entre tamanhos de cadeia e IV ainda não foi encontrada, diferentemente do que ocorre para a viscosidade, uma vez que muitos perfis de ácidos graxos bem como diferentes estruturas

podem produzir o mesmo IV (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; CERMAK; ISBELL, 2009). Entretanto, segundo AKERMAN e colaboradores (2011), foi observada uma tendência geral de aumento do ponto de fluidez concomitantemente com o aumento do IV devido ao incremento da cadeia alquílica dos ácidos graxos dentro da faixa de C5 a C18. Além disto, pela literatura, estolídeos acabados originam melhores Ivs do que estolídeos mono-acabados (ISBELL et al., 2006).

Capítulo 4

4 Materiais e metodologia comum

4.1 Materiais

Para realizar este trabalho, foi utilizado o óleo de mamona comprado da empresa Campestre (São Bernardo do Campo, Brasil); as sementes de mamona e o ácido ricinoléico comercial foram gentilmente doados pela empresa Bioóleo Bahia (Feira de Santana, Brasil) e Miracema-Nuodex (Jardim São José, Brasil), respectivamente; o acetato de etila grau analítico foi comprado da LabSinth.

Os poliálcoois utilizados no Capítulo 6 foram: neopentilglicol (NPG), trimethilolpropano (TMP) e pentaeritritol (PE) — comprados da Sigma-Aldrich (Jurubatuba, Brasil) e as lipases comerciais utilizadas foram: a lipase liofilizada de *Candida rugosa*, Lipomod™ 34 MDP (CRL) obtida da Biocatalysts Inc. (UK); a lipase de *Candida antarctica* imobilizada na resina aniônica macroporosa Duolite A568 - Novozyme 435 (CALB), e a de *Rhizomucor miehei* imobilizada em resina de troca aniônica - Lipozyme RM-IM (RM-IM) sendo estas duas últimas da Novozymes (Araucária, Brasil).

Para a análise no cromatógrafo gasoso desenvolvida no Capítulo 7 e utilizada nos Capítulos 7 e 8, o catalisador, cloreto de acetila, foi adquirido da Merck (São Paulo, Brasil); o bicarbonato de potássio foi obtido da Sigma-Aldrich (Jurubatuba, Brazil) e os solventes: Isopropanol (99.8%), etanol (99%) e n-hexano (95%) foram adquiridos da TEDIA (Fairfield, USA).

Para as reações de esterificação dos estolídeos livres e mono-acabados, o etanol (99,8%) foi obtido do Labsynth (Brasil) e o 2-etil-1-hexanol (99,6%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Jurubatuba, Brazil).

4.2 Metodologia

4.2.1 Análise de detecção de ácidos graxos livres (AGL)

O monitoramento da produção e da diminuição de ácidos livres nas reações de hidrólise e de esterificação, respectivamente, que consta nos Capítulos 5 a 8 foi realizado pela titulação dos ácidos livres, liberados ao longo da reação. Cem microlitros de amostra foram pesados em balança analítica e, em seguida, submetido à titulação, em triplicatas para cada ponto analisado. A reações foram paralisadas com 40 mL de solução de acetona:etanol 1:1 (v/v) e o teor de ácidos liberados foi determinado em titulador automático Mettler Toledo G20 até pH 11,0 com solução de NaOH 0,04 mol/L. Os brancos reacionais, sem adição de enzimas, foram realizados nas mesmas condições. O teor de ácidos livres foi calculado pela Equação 1:

$$A_L = \frac{MM \times N \times V}{10 \times m_{am}}$$

Equação 1

Sendo:

A_L = teor de ácidos livres (% - m/m de ácido livres da amostra)

MM= massa molar do ácido de maior porcentagem no óleo (298,46 g)

V = volume de NaOH titulado menos o volume utilizado na titulação do branco (mL)

N = normalidade da solução de NaOH

m_{am} = massa de amostra (g)

4.2.2 Propriedades físicas e funcionais dos biolubrificantes

A qualidade dos biolubrificantes é uma indicação do tempo esperado para que tal lubrificante mantenha seu desempenho inalterado. A caracterização dos biolubrificantes

quanto as suas propriedades físicas e funcionais, foi realizada a partir dos produtos obtidos nos tópicos 6.5, 7.4, 7.5 e 8.3. Os produtos obtidos foram caracterizados conforme descrito em DA SILVA *et al.*, 2015. A viscosidade cinemática a 40 e 100 °C foi determinada de acordo com ASTM D 445 e o índice de viscosidade foi determinado por meio do cálculo descrito na ASTM D 2270 que leva em consideração as duas viscosidades supracitadas. O ponto de fluidez foi analisado de acordo com o método descrito na ASTM D 97. A estabilidade oxidativa foi determinada utilizando o método da bomba rotatória (RPVOT) de acordo com a ASTM D 2272. Além destes, o índice de acidez total também foi determinado de acordo com a norma oficial AOCS Te 1a-64 (1997) por meio de titulação potenciométrica utilizando KOH (0.1 mol l⁻¹) até que todos os ácidos fossem neutralizados. Todos estes parâmetros serão detalhados nos tópicos que se seguem.

4.2.2.1 Estabilidade oxidativa pela bomba rotatória (RPVOT)

Este ensaio de estabilidade oxidativa segue a norma ASTM D 2272, no qual, a amostra de óleo é inserida em um recipiente de aço com um catalisador metálico padronizado (Cobre). Este recipiente foi então pressurizado com oxigênio (90 psi) e posteriormente mantido em um banho de silicone a 150 °C. Conforme o oxigênio é consumido, a pressão diminui representando a oxidação do óleo. Sendo assim, quanto maior o tempo necessário para se consumir o oxigênio mais resistente o óleo será à oxidação. Neste método, o tempo necessário para uma redução de 25 psi é medido e é expresso como a estabilidade oxidativa.

4.2.2.2 Ponto de fluidez – ASTM D 97

Este ensaio foi avaliado segundo a ASTM D 97. Primeiramente, a amostra é aquecida e posteriormente resfriada a uma taxa especifica, e observada em intervalos de 3 °C para avaliação de suas características de escoamento. A menor temperatura na qual ainda se observa movimento do fluido é referenciada como o Ponto de Fluidez.

4.2.2.3 Viscosidade cinemática - ASTM D 445

O ensaio de viscosidade cinemática foi feito de acordo com a ASTM D 445 na qual um volume fixo de amostra é adicionado a um tubo viscosimétrico calibrado (Cannon Fenske). O tubo é então colocado em banho com temperatura especificada e rigorosamente controlada (± 0,01 °C). Em seguida, determinou-se o tempo para que o volume da amostra escoe sob gravidade através do capilar do viscosímetro. A viscosidade cinemática foi obtida pelo produto do tempo de escoamento medido pela constante de calibração do viscosímetro na unidade de centistokes ou mm²/s.

4.2.2.4 Índice de viscosidade

O Índice de viscosidade (IV) é um parâmetro utilizado para caracterizar a variação da viscosidade cinemática de um produto derivado do petróleo com a temperatura. É um número adimensional obtido pelos cálculos descritos na ASTM D 2270 que prevê cálculos para valores de IV ≤ 100 e para valores de IV > 100 baseado na medição prévia das viscosidades a 40 °C e a 100 °C da amostra. Quanto maior o IV menor a alteração da viscosidade de um produto com a variação da temperatura.

Para IV ≤ 100 é utilizada a Equação 2

$$IV = \left[\frac{L - U}{L - H}\right] \times 100$$

Equação 2

Quando IV > 100 os cálculos utilizados estão na Equação 3 e na Equação 4:

IV =
$$\left[\frac{(\text{antilog N}) - 1}{0,00715} \right] + 100$$

Equação 3

$$N = \frac{\log H - \log U}{\log L}$$

Equação 4

Nas quais:

L e H: parâmetros que podem ser extraídos de uma tabela, dependendo do valor da viscosidade a 100 °C da amostra, ou podem ser calculados (cSt);

U: viscosidade cinemática a 40 °C da amostra (cSt).

Para os cálculos foi utilizado o programa "CALTUDO", desenvolvido em VisualBasic, o qual fornece o IV do lubrificante a partir das suas viscosidades a 40 e 100°C.

4.2.2.5 Índice de acidez total

A acidez do produto foi determinado pelo índice de acidez total (IAT) ou valor de ácido (acid value), de acordo com a norma AOCS Te 1a-64 (1997), na qual IAT é a massa de hidróxido de potássio (mg) necessária para neutralizar os ácidos graxos presentes em 1 g de amostra. Esse índice corresponde à concentração de grupos carboxila presente no meio reacional, que decresce devido à formação do estolídeo. A Equação 5 foi empregada para a determinação do IAT:

$$IAT = \frac{V_{KOH} \times M \times 56,10}{m}$$

Equação 5

Na qual:

V_{KOH} = volume de KOH utilizado para a amostra diminuído do branco reacional (mL)

M = molaridade da solução de KOH

56,10 = massa molar do KOH (g)

m = massa de amostra (g)

IAT = índice de acidez total (mg de KOH/g de amostra).

Capítulo 5

5 Estudo das condições de hidrólise do óleo de mamona

Neste capítulo, está descrita metodologia específica utilizada e os resultados obtidos para obtenção dos ácidos graxos livres de mamona (AGLM), por meio da hidrólise enzimática do óleo de mamona. Esta hidrólise foi desenvolvida como uma proposta de baixo custo e que garante um produto final de qualidade e sem degradação de suas propriedades naturais, uma vez que é realizada em temperaturas amenas e com as próprias sementes de mamoneira. Para cumprir tal objetivo foi utilizada a metodologia discriminada abaixo, além da descrita no tópico 4.2.1.

5.1 Determinação da atividade hidrolítica das sementes de mamona

As sementes de mamona, utilizadas na metodologia de hidrólise do óleo de mamona desenvolvida nesta tese, foram avaliadas quanto a sua atividade de hidrólise de acordo com a metodologia descrita por CAVALCANTI et al., 2007. Com este fim, foi produzido o extrato acetônico para posteriormente ser avaliada a atividade referente a este extrato e então utilizar as sementes como biocatalisador da hidrólise do óleo de mamona.

5.1.1 Extrato acetônico das sementes de mamona

O extrato acetônico das sementes de mamona foi obtido pela adição de 150 mL de acetona a 4 °C em 10,0 g de sementes. Essa mistura foi triturada em mixer e peneirada para obter partículas menores que 500 µm. Estas foram lavadas com 300 mL de acetona, a 4 °C, e incubados com 150 mL de acetona durante 16 h. Após a incubação, a mistura foi filtrada e lavada com 150 mL de acetona. O pó, livre de gordura, foi deixado em um balão aberto durante 24 h até completa remoção da acetona residual e depois armazenado a 4 °C para posterior uso na determinação da atividade hidrolítica (CAVALCANTI et al., 2007).

5.1.2 Ensaio de atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica do extrato acetônico de sementes de mamona foi determinada utilizando como substrato a tributirina a 5% (m/v) emulsionada com 25% (m/v) de Triton X-100 em tampão acetato, 0,1M, pH 4,0 (50%, v/v), completado com água destilada para o volume total. Noventa miligramas do extrato acetônico foi adicionado a 10 mL de emulsão e incubado por 3, 5 e 7 minutos a 37 °C sob agitação constante a 200 rpm. A reação foi interrompida pela adição de 20 mL de acetona:etanol (1:1), que também promove a extração dos ácidos graxos liberados, e esta mistura foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação (200 rpm). Os brancos reacionais foram obtidos adicionando as 90 mg de extrato acetônico após a acetona:etanol. Os ácidos graxos foram titulados com solução 0,04 M de NaOH em titulador automático Mettler Toledo G20 até o valor de pH final de 11,0. Uma unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima (g de extrato acetônico) capaz de catalisar a liberação de 1 μmol de ácido graxo livre por min (em condições de velocidade inicial) (CAVALCANTI et al., 2007).

5.2 Hidrólise do óleo de mamona e recuperação dos ácidos graxos livres de mamona (AGLM).

5.2.1 Hidrólise do óleo de mamona

Trinta gramas de sementes de mamona foram adicionadas a 150 mL de tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,0, mantendo a razão de 1:5 (m/v). Esta reação foi realizada primeiramente com sementes cuja atividade lipásica foi de 360 U/g e depois com sementes cuja atividade foi de 226 U/g. Esta mistura foi triturada em mixer por 2 min e foi transferida para reatores encamisados mantidos a temperatura de 30 °C sob agitação mecânica à 200 rpm. Esta reação foi nomeada de hidrólise do óleo endógeno uma vez que trata da hidrólise do óleo presente nas sementes.

Para aumentar a concentração de AGLM obtidos ao final da hidrólise, esta reação também foi realizada com óleo de mamona extra, no que foi chamado hidrólise do óleo de

mamona. Este óleo foi adicionado à mistura de tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,0 e sementes, no mesmo volume do tampão (150 mL), mantendo a razão de sementes:tampão:óleo de 1:5:5 (m/v/v).

Ambas misturas formaram uma emulsão de cor branca na qual as sementes de mamona, que contém lipases endógenas, atuaram como um biocatalisador, hidrolisando o todo óleo de mamona (endógeno e extra) presente no meio reacional. As reações foram realizadas em duplicatas biológicas e cada replicata foi analisada em triplicata. O teor de AGLM foi avaliado pela titulação dos mesmos segundo metodologia descrita em 4.2.1.

5.2.2 Recuperação dos AGLM

As reações descritas na seção 5.2.1 foram paralisadas com a adição do solvente acetato de etila na razão 2:1 (v/v): meio reacional com o objetivo de extrair os AGLM. O meio reacional formou, então, duas fases: 1) fase superior, contendo o acetato de etila, AGLM dissolvidos e algumas partículas menores provenientes da trituração das sementes; 2) fase inferior, contendo uma emulsão formada de sementes trituradas, tampão, acetato de etila e glicerol. A fase superior (1) foi recuperada e armazenada, enquanto a fase inferior (2) foi centrifugada por 5 min a 10.000 rpm para separar a emulsão e recuperar os AGLM dissolvidos no solvente e retirar o biocatalisador, que foi lavado com 300 mL de acetato de etila para recuperar o AGLM ainda remanescentes. O solvente armazenado foi pesado e a ele, 10% (m/v) de sulfato de sódio anidro foram adicionados. A mistura foi mantida sob agitação magnética, fechada, em capela, por 30 min para absorver a água presente no solvente. Posteriormente, a agitação foi parada e, após a decantação do sulfato de sódio anidro, o solvente rico em AGLM foi filtrado em papel de filtro. O solvente foi recuperado em rotaevaporador (PolyScience®) para ser reutilizado e os AGLM armazenados até seu uso.

5.3 Cromatografia gasosa

5.3.1 Metilação dos Ácidos Graxos Livres para Análise por Cromatografia Gasosa

Oito microlitros das amostras foram transferidas para tubos de hidrólise, no qual foi adicionado 3,0 mL da solução de metanol:hexano (4:1 v/v) e em seguida 300 μL de cloreto de acetila (catalisador), sob agitação suave. Os tubos foram fechados em atmosfera de N₂, seguindo-se o aquecimento em banho maria com agitação a 100 °C por 1 h; em seguida, os tubos foram resfriados a temperatura ambiente. Adicionou-se lentamente 3,0 mL de KHCO₃ (10 % m/v) para paralisar a reação e neutralizar o catalisador, seguindo-se a agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação a 2.000 rpm por 10 min. Após centrifugação, a fase superior (orgânica) foi então transferida cuidadosamente para frascos de armazenagem de 2,0 mL e as amostras foram analisadas em cromatógrafo gasoso (CG). As análises foram feitas em triplicata e o ensaio em branco foi realizado com água deionizada (LEPAGE; ROY, 1986).

5.3.2 Análise da Composição em Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

Os ácidos graxos que foram metilados de acordo com o tópico 5.3.1, para serem convertidos em compostos mais voláteis, seguiram para a análise em cromatógrafo gasoso Shimadzu GCMS-QP2010 em coluna Omegawax 320 Supelco (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm) com detector de ionização de chama (FID). As temperaturas do injetor e do detector foram de 260 e 280 °C, respectivamente. A temperatura inicial da coluna foi de 150 °C, chegando a 210 °C no final da corrida. A rampa de corrida aplicada iniciou com a temperatura de 150 °C por 5 min, seguida por um aumento até 210 °C, com uma rampa de 2 °C/min. A corrida foi mantida isotermicamente por 30 min. Foi utilizada a razão de split: 1:20, volume de injeção foi de 1 µL, e o fluxo do gás de arraste (hélio) foi de 1,1 mL / min.

A identificação dos ácidos graxos foi determinado pela comparação com a solução padrão comercial contendo 37 ésteres metílicos de ácidos graxos (Supelco® 37 FAME Mix) adquirida da Sigma-Aldrich.

5.4 Resultados

5.4.1 Hidrólise do óleo de mamona

A hidrólise de óleos ricos em hidroxiácidos, como o óleo de mamona, é normalmente realizada em altas temperaturas e pressões o que não é recomendado, uma vez que podem levar à formação de estolídeos e fornecem produtos com alterações de cor e odor (GOSWAMI et al., 2010). Ademais, ocorre formação de grande quantidade de borra ácida e água dura no processo, além de ser obtida uma glicerina de baixa qualidade (GOMES et al., 2013; SATYARTHI; SRINIVAS; RATNASAMY, 2011). Esta hidrólise também pode ser realizada de forma não catalítica utilizando vapor superaquecido o que necessita de reatores feitos de materiais resistentes à corrosão, e que, fora os problemas relativos à qualidade do produto, torna o processo caro e com alto consumo de energia (HOLLIDAY; KING; LIST, 1997). Desta forma, alternativamente, a hidrólise enzimática do óleo de mamona tem sido estudada amplamente na literatura.

KHASKHELI et al. (2015) estudando a otimização da hidrólise enzimática do óleo de mamona, empregaram lipases comerciais de *Rhizopus oryzae* em um sistema de emulsão óleo-água em uma relação óleo: água 1:4, na qual a reação foi conduzida por 12 h a 37 °C para obter 90% m/m de ácidos graxos livres. GOMES et al. (2013) com o objetivo principal de utilizar o óleo de mamona hidrolisado na produção de aromas, desenvolveu um procedimento de hidrólise utilizando lipases comerciais. Eles obtiveram o melhor resultado com a enzima Lipozyme TL-IM, alcançando, 95% de ácidos graxos livres às 25 h, em pH 8,0 e temperatura de 27 °C. Normalmente, os processos enzimáticos relatados na literatura requerem tempos longos para obter um alto nível de AGLM, necessitam de solventes para a recuperação, que nem sempre são compatíveis com o meio ambiente, e utilizam enzimas comerciais, o que aumenta o custo final.

Neste trabalho, foi desenvolvida uma estratégia para hidrolisar o óleo de mamona na qual o biocatalisador é composto das lipases presentes nas sementes dormentes de mamona (AVELAR et al., 2013; FUCHS; VINE; HILLS, 1996). Apesar de ser necessário o uso de solvente para a extração dos AGLM após hidrólise, conforme descrito no tópico 5.2.2, este solvente é descrito no Guia para indústrias (Food and drug administration. Guide for industry Q3C", 2012) como pertencente à classe 3, que inclui solventes que não apresentam riscos para a saúde humana, e têm baixa toxicidade. Além disto, este solvente é recuperado e reutilizado, neste processo ou em outros, por meio da sua condensação em rotaevaporador. Assim, o objetivo desta etapa foi obter, por via enzimática, os ácidos graxos livres do óleo de mamona (AGLM), que contém cerca de 90% de ácido ricinoléico em sua composição.

Inicialmente, foi avaliada a produção dos AGLM pelo processo que denominamos de hidrólise do óleo endógeno e consiste na hidrólise do óleo presente nas sementes de mamona catalisada pela lipase também presente nas sementes dormentes de mamona. Para tal, as sementes de mamona foram trituradas em presença de tampão e, em seguida, essa mistura foi incubada em reator agitado onde a reação de hidrólise continuou a ocorrer. O resultado deste processo de hidrólise do óleo endógeno, primeiramente foi realizado com sementes cuja atividade era de 360 U/g, e está apresentado na Figura 18.

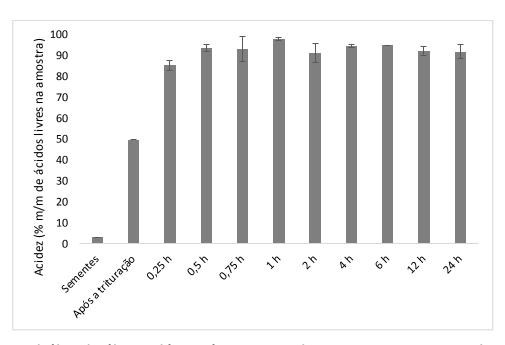


Figura 18 Hidrólise do óleo endógeno às sementes de mamona. As sementes de mamona (360 U/g) foram trituradas em mixer junto com tampão acetato de sódio, 0,1 M, pH 4,0, na razão semente/tampão de 1:5 (m/v). Após trituração, a mistura foi incubada à 30 °C sob agitação (tempos de 0,25 a 24 h).

O processo de hidrólise do óleo endógeno gerou um óleo cuja acidez liberada foi de 97,8 ± 0,7% m/m em apenas 1h de incubação. Apesar da taxa de hidrólise ter sido elevada, este lipídio encontrava-se em baixa concentração no meio reacional uma vez que foi proveniente das sementes de mamona, que contém apenas 45 - 50% da sua massa em óleo (TAMBASCIA; TEIXEIRA, 1986). Sendo assim gerado uma pequena concentração de AGLM no meio reacional uma vez que são provenientes da hidrólise do óleo presente nas sementes de mamona. Para aumentar esta concentração, foi mantida a relação 1:5 (m/v) de sementes/tampão e foi adicionado, a esta mistura, uma quantidade extra de óleo de mamona, no mesmo volume do tampão. Esta mistura foi triturada e incubada em reator para a reação de hidrólise. No entanto, devido a mudança do lote das sementes, a atividade caiu para 225,7 ± 0,5 U / g e devido a isto, por comparação, novamente foi realizada a reação de hidrólise do óleo endógeno. O resultado dessas hidrólises está apresentado na Figura 19.

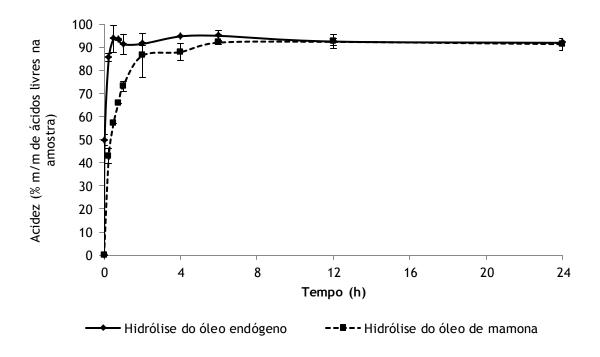


Figura 19 Hidrólise endógena x Hidrólise do óleo de mamona. Esta figura trata da comparação entre hidrólise apenas do óleo endógeno (presente nas sementes ou com óleo de mamona extra adicionado no processo. Para ambos os procedimentos de hidrólise, as sementes de mamona (com atividade lipásica de 226 U / g) foram trituradas em mixer, junto com tampão, 0,1 M, pH 4,0, na razão semente/tampão /óleo de 1:5:5 (m/v/v). Após a trituração, a mistura foi incubada a 30 °C, sob agitação magnética constante. O óleo foi extraído e a sua acidez foi determinada por titulação com NaOH 0,04 M.

Os AGLM produzidos na hidrólise do óleo endógeno atingiu, em apenas 15 minutos, a acidez de 85,36 ± 2,5% m/m; em 45 min de reação, 93,13 ± 5,9% m/m; e em 4 h, 94,62 ± 0,8% m/m (Figura 19). No entanto, como já dito, a quantidade gerada de AGLM/mL de reação é ínfima e dependente da massa de sementes sendo que esta não pode ser aumentada e a razão tem que ser mantida segundo testes prévios não mostrados neste documento. Sendo assim para aumentarmos a concentração de AGLM/mL de meio reacional foi realizada, em comparação com a reação anterior, a hidrólise com o óleo de mamona extra (fora o das sementes) cuja cinética também é demonstrada na Figura 19. A reação de hidrólise do óleo de mamona produziu, em 15 minutos, 42,83 ± 3,2% m/m; em 4 h, 87,83 ± 3,67% m/m; e, em 6 h de reação, 91,9 ± 0,7% m/m. A produtividade em g AGLM/h calculada em 6 h nas reações com óleo endógeno e óleo de mamona extra foram 15,3 e 15,8, respectivamente, no entanto, considerando que a hidrólise do óleo de mamona contém 6

vezes mais óleo para a mesma quantidade de enzima teremos uma produtividade de 93,6 g AGLM/h para a hidrólise do óleo de mamona. Desta forma, a condição com adição de óleo de mamona (maior concentração de substrato) foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

Nesta reação, as condições de temperatura e pH já foram descritas anteriormente como sendo ótimas para as lipases dormentes de mamona (CAVALCANTI et al., 2007), no entanto, ainda existem parâmetros que poderão ser melhorados, dentre eles a agitação. Segundo a literatura a agitação vigorosa é necessária para manter a emulsão durante a reação (SYAIMA et al., 2015). SYAIMA et al (2015) estudaram, em seu trabalho, a hidrólise do efluente do moinho de óleo de palma (palm oil mil efluente - POME) utilizando lipases de Candida sp. Os autores variaram a agitação de 500 para 950 rpm e observaram que, inicialmente, o aumento da agitação diminui o tamanho das gotículas aumentando a área superficial entre o óleo e a enzima na fase aquosa, proporcionando maiores taxas iniciais nas reações de hidrólise. Entretanto, o uso prolongado de agitações acima de 650 não foi adequado devido, provavelmente, ao cisalhamento da enzima (SALIH; SALIMON; YOUSIF, 2011; SYAIMA et al., 2015). A agitação utilizada, neste trabalho, foi de 200 rpm, e apenas a mudança da agitação magnética para a agitação mecânica com o auxílio de um rotor (durante o trabalho), já fez a acidez máxima do processo aumentar para 95 -98% m/m o que sugere que o aumento da agitação poderá ser um parâmetro importante na otimização do processo de hidrólise.

Nesta etapa do trabalho, foi possível realizar uma hidrólise com alta taxa inicial de reação, utilizando lipases provenientes da trituração de sementes em condições de reação brandas. Além disso, a baixa toxicidade do solvente utilizado para recuperar os AGLM, faz com que este processo se enquadre nos princípios da química verde. Deste modo, esta etapa foi escolhida como primeiro passo na nova rota de produção de biolubrificantes utilizando óleo de mamona.

5.4.2 Comparação entre o AGLM obtido e o comercial

As composições de ácidos graxos livres dos AGLM, produzidos pela metodologia desenvolvida deste trabalho, e o AGLM comercial são muito similares (Tabela 5). No entanto, a amostra comercial têm uma porcentagem (m/m) 4 vezes maior de compostos indeterminados. Este índice de ácidos graxos não identificados da AGLM comercial pode estar relacionado a produtos de degradação térmica do óleo de mamona e/ou dos AGLM.

Tabela 5 Comparação entre a composição de ácidos graxos livres (AGLs) obtidos por hidrólise enzimática (próprio) e o comercial

Companie and a ACI	Próprio	Comercial		
Composição de AGL	(% m/m AGLs na amostra)	(% m/m AGLs na amostra)		
Ácido palmítico C16:0	1,02 ± 0,01	1,01 ± 0,05		
Ácido esteárico C18:0	0,70 ± 0,01	0,39 ± 0,03		
Ácido oléico C18:1n9	2,73 ± 0,02	2,82 ± 0,15		
Ácido linoléico C18:2n6	4,96 ± 0,06	3,48 ± 1,18		
Ácido α-linolênico C18:3n3	0,47 ± 0,03	0,43 ± 0,02		
Ácido behênico C22:0	1,43 ± 0,31	2,17 ± 0,89		
Ácido ricinoléico C18:1- OH	87,57 ± 0,15	85,61 ±2,75		
Não identificados	0,95 ± 0,25	4,308 ± 2,7		

Essa diferença na qualidade das amostras dos dois processos é perceptível não apenas pela falta de odor, mas também pela aparência das duas amostras em quantidades

semelhantes, como visto na Figura 20. AGLM comercial (B) é avermelhado e turvo, enquanto AGLM próprio (A) é amarelado, mais próximo da cor do óleo de mamona (C) ambos translúcidos. Tal fato sugere que a hidrólise realizada para obtenção da amostra comercial pode promover a degradação parcial do óleo de mamona ou de seus AGLM.

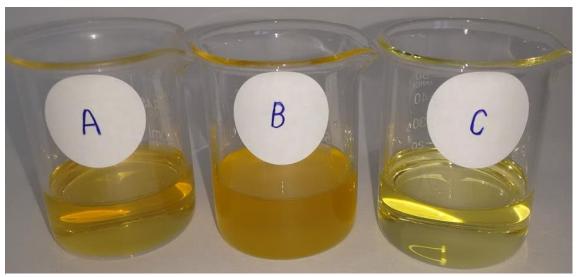


Figura 20 Comparação entre o AGLM obtido por hidrólise enzimática (A); comercial (B) e o óleo de mamona (C)

Capítulo 6

6 Estudo da produção de biolubrificantes com polialcoóis

Neste capitulo, estão descritas a metodologia utilizada e os resultados obtidos para produção de ésteres com propriedades lubrificantes, por meio da esterificação dos ácidos graxos livres de mamona (AGLM). Foram realizadas reações de esterificação na ausência e na presença de poliálcoois, com 2, 3 e 4 hidroxilas (neopentilglicol, trimetilolpropano e pentaeritritol). Para cumprir tal objetivo foi utilizada a metodologia aplicada abaixo, além do tópico 4.2.1, 4.2.2 e da metodologia para produção dos AGLM descrita no Capítulo 5.

6.1 Determinação das atividades lipásicas

Todas as enzimas comerciais utilizadas neste trabalho foram avaliadas quanto a sua atividade hidrolítica e de esterificação, antes de iniciarmos os testes.

6.1.1 Atividade hidrolítica

A determinação da atividade hidrolítica, das lipases comerciais utilizadas, foi realizada usando, como substrato, o éster p-nitrofenil laurato (pNPL), 25 mM, em acetonitrila:dimetilsulfóxido, UV/HPLC, na razão 1:1 (v/v). Desta solução, 0,25 mL foram solubilizados em 2,2 mL de tampão fosfato, 25 mM, pH 7,0, compondo o branco reacional. A reação, realizada em triplicata, foi conduzida a 30 °C e, foi iniciada com a adição de 0,05 mL de enzima (GUTARRA et al., 2009). O aumento da absorbância foi acompanhado, em 412 ηm, pela produção cromóforo p-nitrofenol (pNP), de cor amarelada, proveniente da hidrólise do pNP-laurato. Uma unidade de atividade hidrolítica (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formação de 1 μmol de pNP, por minuto, nas condições reacionais dadas.

6.1.2 Atividade de esterificação

A determinação da atividade de esterificação das lipases utilizadas foi realizada com a reação de esterificação entre o ácido oléico: etanol 1:1 (m/m), usando a enzima a 3% (m/m) dos substratos, sendo a CRL utilizada na quantidade de 1%. As reações foram realizadas em reatores fechados e encamisados, cujo volume total é de 20 mL, mantidos a 40 °C, e agitados magneticamente. Triplicatas de 100 μL foram retiradas, em determinados tempos reacionais, e adicionadas a 60 mL de acetona:etanol, 1:1 (v/v). Os ácidos graxos livres remanescentes foram analisados por titulação com NaOH, 0,04 M (SOUZA et al., 2009). Uma unidade de atividade de esterificação (U) foi definida como a quantidade de lipase necessária para consumir 1 μmol de ácidos graxos por minuto.

6.2 Esterificação dos AGLM

6.2.1 Avaliação de diferentes enzimas

Na etapa de seleção de enzimas mais apropriadas para a reação de esterificação dos AGLM foram utilizadas as lipases CRL, CALB e RM-IM, cuja natureza está descrita nos Materiais (tópico 4.1), com os poliálcoois NPG, TMP e PE, descritos no mesmo tópico, seguindo a razão molar de 2,5:1; 3,75:1 e 5:1, respectivamente. A razão molar variou, de acordo com o poliálcool utilizado, de forma a manter a mesma razão entre número de hidroxilas do poliálcool e os AGLM.

As reações foram conduzidas em reatores encamisados (volume total de 30 mL) a 40 °C com agitação magnética constante e o início da reação foi dado com a adição de enzima na proporção de 4% m/m em relação aos AGLM. Em 24 e 96 h de reação, foram retiradas alíquotas e a mistura reacional foi centrifugada 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi armazenado a 4 °C até ser analisado pelo método titulométrico (descrito em 4.2.1). A conversão em ésteres (porcentagem de redução de acidez) foi calculada com base no item 6.3 (Equação 6).

6.2.2 Aplicação da enzima CRL na esterificação dos AGLM

Depois da escolha da enzima mais ativa, novas reações foram realizadas, com a adição de água (1% m/m de AGLM) ao meio reacional, visando compará-las quanto a conversão dos AGLM e facilitar a solubilização dos poliálcoois. As reações foram realizadas para os três poliálcoois, NPG, TMP e PE, nas razões molares 2,5:1; 3,75:1 e 5:1, respectivamente. Alíquotas foram retiradas em 24 e 94 h de reação.

Para compreender se o aumento da concentração de água no meio reacional influencia a reação com o PE, que é o poliálcool menos solúvel, novas reações foram realizadas na ausência e com a adição de 1, 3 e 5% de água (m/m dos AGLM) com PE na razão molar 5:1. Alíquotas foram retiradas em 24 e 68 h.

Todas as reações de esterificação foram conduzidas em reatores de vidro cilíndricos e abertos (50 mL), termostatizados a 40 °C, com agitação magnética constante e adição de 4 % (m/m dos AGLM) de CRL. No final da reação, a mistura foi centrifugada (10.000 rpm por 5 min) e o sobrenadante armazenado a 4 °C até a sua análise. Os produtos destas reações foram analisados com base no item 6.3 (Equação 6 e Equação 7).

Além destas reações, foram realizadas também reações sem a adição de quaisquer poliácool, reações controle e somente os AGLM, sem CRL, para se investigar a produção de estolídeos (BÓDALO et al., 2008). Nestas últimas, apenas foi realizada a titulação dos ácidos graxos livres (descrito em 4.2.1).

6.3 Cálculo da conversão dos AGLM em ésteres

Como forma de quantificação indireta da síntese de biolubrificantes derivados dos poliálcoois, a conversão de AGLM em biolubrificantes foi acompanhada pelo método titulométrico (acidez), no qual foi quantificado o consumo dos AGLM. A determinação da

acidez foi então realizada, conforme descrito no item 4.2.1, e a conversão da reação foi calculada segundo a Equação 6 ou a Equação 7.

Na Equação 6, os resultados estão expressos na forma de porcentagem de AGLM esterificado, de forma que 100% de conversão equivale a 100% dos AGLM esterificados. Na Equação 7 os resultados estão expressos na forma de porcentagem de hidroxilas dos poliálcoois esterificadas, de forma que 100% de conversão equivale a 100% das hidroxilas esterificadas.

Conversão (%AGLM) =
$$\frac{100 \times (A_i - A_f)}{A_i}$$

Equação 6

$$Conversão (\% \ hidroxilas) = \frac{100 \times (A_i - A_f) \times RM}{H \times A_i}$$

Equação 7

Onde:

 $A_i = acidez inicial (% m/m);$

 $A_f = acidez final (% m/m);$

RM = razão molar inicial AGLM/álcool;

H = número de hidroxilas na molécula do álcool.

6.4 Análise dos produtos da reação por ressonância magnética nuclear (RMN)

Para a avaliação estrutural molecular dos produtos, as amostras foram submetidas à análise por RMN de ¹H e ¹³C para identificação dos produtos provenientes das diferentes reações. Nas análises, as amostras foram misturadas com clorofórmio deuterado (CDCl₃) à 25 °C na concentração de 5% (¹H) e 20% (¹³C). Cada amostra foi analisada no espectrômetro Agilent INOVA-300 (7,05 T de campo magnético) e foram comparadas às moléculas puras da

biblioteca espectral de RMN (DUARTE et al., 2016). Foram utilizadas as seguintes condições experimentais:

¹ H	¹³ C	¹³ C APT Frequência: 75,439 MHz
	Frequência: 75,438 MHz	Janela espectral: 18,8 KHz
Frequência: 299,982 MHz	Janela espectral: 18,8 kHz	Tempo de aquisição: 1,3 s
Janela espectral: 4,8 kHz	Tempo de aquisição: 0,9 s	Pulso (P2): (135°)
Tempo de aquisição: 1,7 s	Pulso: 10,8 μs (90°)	Intervalo entre pulsos: 1 s Numero de transientes:
Pulso: 4,25 μs (45°)	Intervalo entre pulsos: 10 s	1300
Intervalo entre pulsos: 15 s Número de transientes: 64	Número de transientes: 2048 Núcleo desacoplado: ¹ H	Núcleo desacoplado: ¹ H
Numero de transferites. 04	Modo do desacoplador: NNY	Modo do desacoplador:
Processamento:	·	YNY J1xh: 140 Hz
Line broadening: 0,3 Hz	Processamento:	J1XII. 140 FIZ
	Line broadening: 1,0 Hz	Processamento:
		Line Broadening (lb): 1,0 Hz

6.5 Aumento de escala para avaliação das características lubrificantes

A análise de RPVOT (descrita em 4.2.2.1) necessita de 200 g de amostra para sua caracterização quanto a estabilidade oxidativa. Sendo assim, foi preciso aumentar a escala de produção para posterior avaliação dos produtos obtidos descrita em 4.2.2.

6.5.1 Avaliação dos produtos derivados dos poliálcoois

O aumento de escala das reações, para a caracterização das propriedades lubrificantes dos ésteres obtidos a partir de diferentes poliálcoois, foram realizadas em reatores contendo 210 g AGLM e os meios reacionais tinham as seguintes composições:

a) AGLM + CRL (4% m/m) + NPG (razão molar 2,5:1);

- b) AGLM + CRL (4% m/m) + TMP (razão molar 3,75:1);
- c) AGLM + CRL (4% m/m) + PE (razão molar 5:1);

Todas as reações foram mantidas a 40 °C, sob constante agitação mecânica de 200 rpm. O início da reação foi dado com a adição da enzima. As reações foram conduzidas por 96 h, conforme os melhores resultados obtidos em 6.2.2.

As reações "a" e "b" também foram realizadas após a solubilização dos poliálcoois. A temperatura das misturas foi aumentada até que os cristais dos poliálcoois fossem solubilizados e, depois, a temperatura foi reduzida para a operacional, de 40 °C, antes da enzima CRL ser adicionada, marcando seu início, as reações foram conduzidas por 24 h.

Ao final das reações, o produto foi centrifugado para separação do biocatalisador, a 10.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi estocado em geladeira, a 4 °C até sua caracterização.

6.5.2 Caracterização da reação controle

A reação controle, sem adição de poliálcool, foi realizada para os AGLM obtidos neste trabalho e os adquiridos comercialmente. O aumento de escala das reações para a caracterização das propriedades lubrificantes destes produtos (estolídeos) foram realizadas em reatores contendo 210 g AGLM próprio e comercial acrescidos de CRL a 4% m/m. As reações foram conduzidas por 96 h à 40 °C, sob constante agitação mecânica de 200 rpm.

6.6 Resultados

6.7 Seleção das enzimas

6.7.1 Atividades enzimáticas

As lipases de *Candida rugosa* (CRL) e *Candida antarctica* (CALB), não específicas, e as lipases de *Rhizomucor miehei* (RM-IM), 1,3-específicas, foram previamente selecionadas, devido ao fato de apresentarem bons resultados de conversão em reações de esterificação e de transesterificação com óleos vegetais (AGUIEIRAS et al., 2014; CAVALCANTI et al., 2018; HAJAR; VAHABZADEH, 2014b; MALHOTRA; MUKHERJEE; GUPTA, 2015; SALIMON et al., 2011). Além disso, as lipases de *Candida rugosa* e *Candida antarctica*, apresentaram elevada taxas reacionais em reações de esterificação com poliálcoois superiores, como o trimetilolpropano (AKERMAN et al., 2011; ÅKERMAN et al., 2011; DA SILVA et al., 2015). Desta forma, para cada uma das enzimas as atividades de hidrólise e de esterificação foram determinadas (Tabela 6), segundo as metodologias descritas no tópico 6.1.

Tabela 6 Atividades lipásicas das enzimas CRL, CALB e RM-IM realizadas segundo metodologias descritas no tópico 6.1

CRL 20470 ± 1400	1403,5 ± 25
	,
CALB 83,2 ± 10	3170,0 ± 322
RM-IM 49,5 ± 5	3243,3 ± 207

A medida das atividades funciona como um parâmetro comparativo para definir se as enzimas estão ativas que é a informação principal uma vez que a ação enzimática depende do substrato utilizado. Na metodologia de análise de esterificação foi utilizado o ácido oléico, que pode, não necessariamente, ser o melhor substrato para a atuação destas enzimas. Desta forma, o estudo da esterificação destas lipases foi realizado por meio da sua

utilização no substrato alvo, sendo padronizadas pela massa de enzima e não atividade utilizada em cada reação.

6.7.2 Avaliação de diferentes enzimas na esterificação dos AGLM

Os AGLM obtidos (item 5.2.1) foram utilizados para todas as reações de esterificação realizadas neste trabalho iniciando pelas reações que avaliaram qual enzima seria a mais indicada para a produção dos biolubrificantes. Para a escolha da enzima foram feitas reações com os três poliálcoois (NPG, TMP e PE) e AGLM, como substrato das diferentes enzimas. Aescolha das razões molares foi realizada com base no trabalho prévio de SILVA, 2012 no qual foram feitas reações entre o biodiesel metílico de mamona e o TMP. Para os demais polialcoóis foi respeitada a mesma relação levando em consideração a quantidade de hidroxilas. Os resultados de conversão dos AGLM podem ser observados na Figura 21.

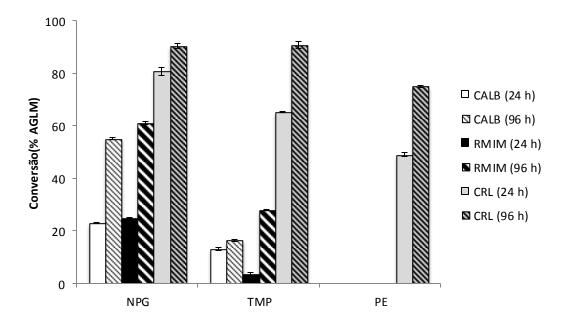


Figura 21 Conversão (% AGLM) das reações de síntese de ésteres catalisadas pelas lipases RM-IM, CALB e CRL. Todas as enzimas foram utilizadas numa concentração de 4% m/m de AGLM. As reações descritas em 6.2 foram conduzidas em reatores encamisados a 40 °C, com agitação constante, usando AGLM e os poliálcoóis: NPG (2,5:1), TMP (3,75:1) ou PE (5:1).

Todas as enzimas avaliadas foram capazes de catalisar alguma conversão dos AGLM em ésteres, usando NPG e TMP. No entanto, usando PE, a reação progrediu apenas parcialmente, quando a CRL foi usada (Figura 21). O uso do NPG alcançou diferentes conversões de acordo com as diferentes lipases. A enzima RM-IM apresentou $24.8 \pm 0.3\%$ de conversão em 24 h e atingiu $61.0 \pm 0.6\%$ em 96 h de reação; A CALB se comportou de forma semelhante a RM-IM e alcançou, em 24 h de reação, $23.0 \pm 0.2\%$ e, em 96 h, $55.1 \pm 0.2\%$. De forma superior a todas as enzimas, a CRL atingiu $80.6 \pm 1.4\%$, em 24 h, e $90.2 \pm 0.9\%$, em 96 h de reação.

O uso de TMP gerou conversões bastante inferiores as lipases RM-IM e CALB. No caso da RM-IM, a conversão dos AGLM em ésteres, em 24 h, foi muito baixa 3,5 \pm 1,5%, atingindo 27,8 \pm 0,3%, em 96 h; A CALB, por sua vez, apresentou 13 \pm 0,5%, em 24 h, sendo, esta conversão, estatisticamente a mesma da conseguida em 96 h, 16,4 \pm 0,4%. Por outro lado, a CRL apresentou os maiores resultados dentre as três enzimas utilizadas, em 24 h a conversão foi de 80,6 \pm 1,4% e 90,7 \pm 1,5% em 96 h.

A utilização de PE, no entanto, não mostrou qualquer resultado quando se utilizou RM-IM ou a CALB, mas para a CRL, a conversão dos AGLM foi de $48.9 \pm 0.8\%$ em 24 h e $74.9 \pm 0.3\%$ em 96 h.

A enzima comercial de *Candida rugosa* foi relatada como catalisador específico para produzir biolubrificantes, utilizando biodiesel de mamona e TMP como substratos (DA SILVA et al., 2015). Segundo DA SILVA et al. (2015), o melhor resultado para a reação entre biodiesel de mamona e TMP foi obtido com o uso da lipase de *C. rugosa* (Lipomod 34 MDP) comparativamente às lipases de *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RM-IM) e *Candida antartica* (Novozym 435). A reação enzimática produziu uma conversão mais alta (98%) em comparação com a catálise química (60%). O melhor desempenho desta enzima para AGLM pode estar relacionado à conformação do sítio ativo da CRL. As lipases de *C. rugosa* possuem em seus sitios ativos a presença de um túnel de acomodação do substrato que apresenta uma conformação em "L" que aparentemente encaixaria perfeitamente com a conformação estrutural do ácido oléico (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2006a). O ácido ricinoléico tem um grupo hidroxila na posição 12, que produz uma configuração na forma de "L" que provavelmente se encaixa melhor no sítio ativo da CRL. Entretanto, segundo DUARTE et al. (2016) a enzima responsável pela transesterificação do biodiesel de mamona com o TMP

esta na faixa de 40 KDa o que segundo DICZFALUSY & ALEXSON (1996) trata-se de duas esterases cujo sítio ativo ainda não foi descrito.

As lipases CALB e RM-IM foram capazes de catalisar as reações apenas com os poliálcoois NPG e TMP. Para todos os três poliálcoois, o melhor resultado ainda foi obtido com a CRL, tanto para o tempo de 24 h como de 96 h apesar da mesma ter apresentado a menor atividade de esterificação (Tabela 6). Sendo assim, esta enzima foi escolhida para dar continuidade ao trabalho.

6.8 Produção de biolubrificantes derivados de poliálcoois pela CRL

Após a escolha da enzima de melhor atuação nos AGLM, foram feitos novos testes da sua capacidade de produção de biolubrificantes conforme descrito em 6.2.2. Apesar da literatura indicar que as reações de esterificação ocorrem em condições aquo-restritas e que a presença de água no meio pode levar ao deslocamento do equilíbrio reacional para a hidrólise, as reações foram realizadas com e sem a presença de 1 % (m/m) de água, uma vez que uma pequena concentração desta pode ser necessária para manter a conformação do sítio catalítico das lipases, favorecendo a reação (KLIBANOV, 1989; YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998). Além disto, a água pode ter sido útil para facilitar a solubilização dos poliálcoois e melhorar a transferência de massa no meio reacional. Os resultados destas reações se encontram descritos na Figura 22.

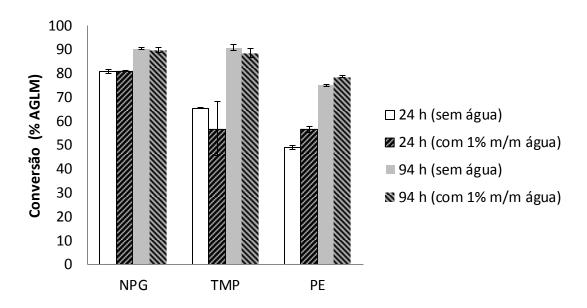


Figura 22 Conversão (expressa como % dos AGLM que foram esterificados) da reação de síntese de biolubrificantes catalisada pela CRL a 4% m/m do AGLM. As reações foram conduzidas na presença e ausência de 1% de água, a 40 °C, em leito agitado, empregando como substrato os AGLM e os poliálcoois NPG (2,5:1), TMP (3,75:1) ou PE (5:1). Alíquotas foram retiradas em 24 e 94 h e foram analisadas pelo método titulométrico para posteriormente ser calculada a conversão dos AGLM (% AGLM).

Os resultados da Figura 22 mostram que, assim como foi observado na Figura 21, grande parte dos AGLM foram consumidos nas reações de esterificação com o NPG (90,2 \pm 0,4% dos AGLM) e com o TMP (90,7 \pm 1,0% dos AGLM) e que os resultados foram similares na presença ou ausência da adição de 1% (m/m) de água. A reação com PE, embora inferior do que com os outros poliálcoois, também mostrou uma boa conversão dos AGLM, sendo ligeiramente maior quando em presença de água (78,5 \pm 0,2 %). Tais resultados indicam que possivelmente o NPG e o TMP são mais reativos do que o PE e que a presença de água não contribuiu para melhorar o desempenho das reações com os poliálcoois NPG e TMP, auxiliando apenas na reação com PE.

Todavia, na síntese de biolubrificantes, é desejável que todas as hidroxilas do álcool sejam esterificadas (RUDNICK, 2006), por isso, os dados da Figura 22 foram expressos na Figura 23 na forma de porcentagem das hidroxilas dos poliálcoois convertidas a ligações éster. Esse cálculo leva em consideração o número de hidroxilas do álcool e a razão molar AGLM/álcool utilizada na reação (Equação 7 da metodologia, tópico 6.3).

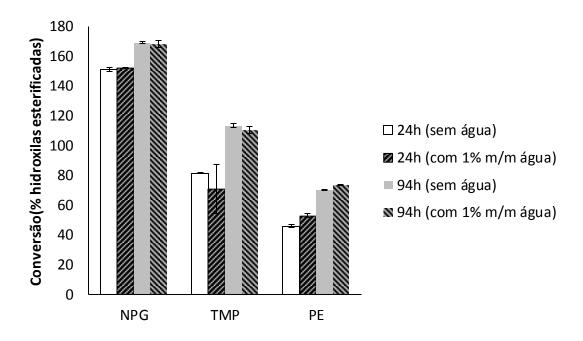


Figura 23 Conversão (expressa como % das hidroxilas do álcool que foram esterificadas) da reação de síntese de biolubrificantes catalisada pela CRL a 4% m/m dos substratos. As reações foram conduzidas na presença e ausência de 1% de água, a 40 °C, em leito agitado, empregando como substrato os AGLM e os poliálcoois NPG (2,5:1), TMP (3,75:1) ou PE (5:1). Alíquotas foram retiradas em 24 e 94 h e foram analisadas pelo método titulométrico, para posteriormente ser calculada a conversão (% hidroxilas esterificadas).

Os resultados da Figura 23 indicam que foi possível obter produtos com 100% das hidroxilas esterificadas para os poliálcoois NPG e TMP, enquanto para o PE apenas 73,6 ± 0,5% das hidroxilas foram esterificadas. Entretanto, foram encontrados valores acima de 100% de conversão, o que indica que deve existir outro produto sendo formado na mesma reação. Possivelmente utilizando as hidroxilas disponíveis nos ácidos ricinoléicos que não foram consideradas neste cálculo.

Como o PE foi o único poliálcool que demonstrou alguma melhoria na reação com a adição de 1% m/m de água, alguns testes foram realizados aumentando a concentração de água na reação, como poderá ser visto no item seguinte, 6.9.

6.9 Avaliação da variação da concentração de água na reação de AGLM e PE.

Dentre todos os poliálcoois analisados o único que demonstrou variação favorável à adição de água foi o PE (conversão de aproximadamente 78,5 ± 0,2% dos AGLM). Possivelmente, a adição de água auxiliou a solubilização deste poliálcool que é o menos solúvel no meio reacional, comparativamente aos NPG e TMP. Desta forma, foram adicionados 1, 3 e 5% de água no meio reacional. Os resultados destes experimento podem ser visualizados na Figura 24

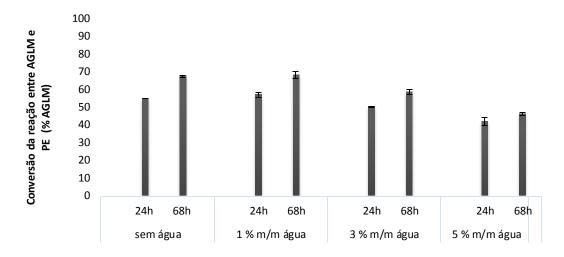


Figura 24 Síntese de biolubrificantes a partir de AGLM e PE utilizando a CRL em quatro condições distintas: ausência e presença de 1, 3 e 5 % m/m de água. As reações foram conduzidas em reatores encamisados a 40 °C, com agitação magnética constante por 68 h.

Como foi possível observar, a adição de 3 e 5% (m/m) de água resultaram em conversões inferiores àquelas observadas com 1% e na ausência da mesma. Tal resultado indica que, possivelmente, o PE apresenta pouca ou nenhuma solubilização no meio, o que o torna um substrato pouco acessível para a enzima, dificultando a transferência de massa no meio reacional. Sendo assim, a análise dos resultados para o PE sugerem que a presença de água no meio reacional não apresentou alteração que justifique o seu uso.

6.10 Avaliação da produção de estolídeos dos AGLM na reação controle

A hipótese levantada para justificar os resultados de conversão superiores a 100% (Figura 23) é a possibilidade da formação de outro produto, utilizando as hidroxilas disponíveis nos ácidos ricinoléicos. Estas hidroxilas livres não entram no cálculo de conversão (baseado nas hidroxilas dos poliálcoois esterificadas) o que dificulta a análise dos resultados baseado na titulação dos AGLM (diminuição da acidez no meio reacional).

Na literatura, são encontrados relatos quanto à formação de poliésteres oligoméricos de ácidos graxos hidroxilados, conhecidos como estolídeos (estolides) (CERMAK; BRANDON; ISBELL, 2006; GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013b; PELAEZ et al., 2003; POTULA et al., 2014; YOSHIDA, YASUKO; MITSUO, KAWASE; CHOZO, 1993). BÓDALO e colaboradores (2005) indicaram o uso da enzima de Candida rugosa para a produção de estolídeos de ácido ricinoléico. O ácido ricinoléico é o principal composto dos AGLM, que representa 90% da sua constituição. Tal ácido possui uma hidroxila no carbono 12 que possibilita a reação de esterificação entre esta hidroxila e a carbonila funcional do terminal carboxílico de outro ácido graxo, formando oligômeros de ácido ricinoléico (BÓDALO et al., 2009). HAYES, 1996 observou, dentre diversas enzimas, que a proveniente da C. rugosa é capaz de produzir estolídeos a partir de hidroxiácidos e que lipases 1,3 específicas, como a de Rhizomucor miehei, não produzem estolídeos. No entanto, TODEA et al., (2015) testaram a aplicação de diversas lipases comerciais na produção de estolídeos de hidroxiácidos naturais e sintéticos e não observam boas conversões em estolídeos utilizando a enzima de C. rugosa. Estes resultados podem estar relacionados ao uso do solvente tolueno como componente do meio reacional, que pode ter contribuído para a desativação destas lipases.

Assim, foi realizada a reação controle, isto é, somente os AGLM e a CRL sem a adição de quaisquer poliálcool. O resultado pode ser observado na Figura 25.

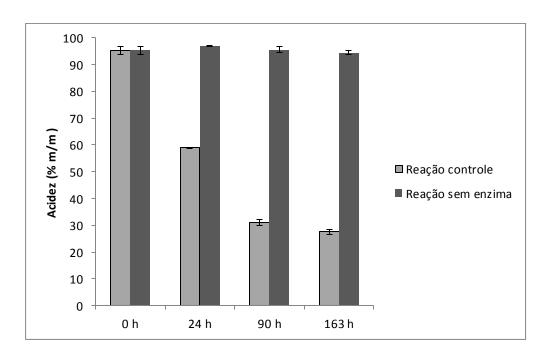


Figura 25: Resultado da acidez (expresso como % m/m AGLM) da reação controle e sem enzima (CRL). As reações foram conduzidas empregando como substrato os AGLM e a 4 % (m/m do AGLM) durante 163 h a 40 °C, em reator de leito agitado.

Na Figura 25, pode ser observado elevada redução de acidez utilizando apenas os AGLM como substrato e a enzima CRL como biocatalisador, enquanto que a reação apenas com o AGLM, sem enzima, manteve a sua acidez constante, conforme a acidez inicial. A acidez da reação controle passa de 95,3% para 32,4 ± 1,2%, em 90 h, e 29 ± 0,9 %, em 163h de reação. Tal resultado comprova que a CRL é capaz de realizar a esterificação entre os AGLM formando estolídeos, o que corrobora com os dados de (BÓDALO-SANTOYO et al., 2005; BÓDALO et al., 2008; HAYES, 1996; YOSHIDA, YASUKO; MITSUO, KAWASE; CHOZO, 1993).

O resultado obtido na reação controle foi semelhante àqueles obtidos para as reações com poliálcoois, sugerindo que a formação de estolídeos pode ser a principal reação catalisada pela CRL. No entanto, apenas a análise de acidez não fornece informações sobre a estrutura dos produtos obtidos nas reações anteriores (Figura 22 e Figura 23). Assim, os produtos foram analisados por ressonância magnética nuclear (RMN), ao final das reações.

6.11 Análises de RMN dos produtos das reações

Com o objetivo de avaliar a constituição molecular dos produtos formados pelas diversas reações realizadas, foram feitas análises de RMN (análises realizadas no CENPES – divisão de PRODUTOS), ao final de 96 h de reação. Os resultados de concentração molar e massa dos substratos, remanescentes na reação após este tempo, e dos produtos formados estão descritos na Tabela 7.

Tabela 7 Resultados das análise de RMN do sobrenadante obtido após centrifugação da reação de AGLM, CRL (4 % m/m) com NPG, TMP e PE e na ausência de poliálcoois, conduzida por 96 h a 40 °C sob agitação magnética constante.

Substratos	Compostos	Molar (%)	Massa (%
AGLM e NPG (razão molar 2,5:1)	NEOPENTILGLICOL (NPG)	6,7	1,3
	DINEOPENTIL RICINOLEATO	13,6	17,1
	MONONEOPENTIL RICINOLEATO	15	10,9
	DÍMERO DO ÁCIDO RICINOLÉICO	64,7	70,7
AGLM e TMP (razão molar — 3,75:1)	TRIMETILOLPROPANO (TMP)	9,8	2,5
	DIMETILOLPROPIL RICINOLEATO	15	19,7
	MONOMETILPROPIL RICINOLEATO	15,1	11,9
	DÍMERO DO ÁCIDO RICINOLÉICO	60,1	65,9
AGLM e PE (razão molar 5:1)	OLIGÔMEROS DO ÁCIDO RICINOLÉICO*	100	100
AGLM (controle)	OLIGÔMEROS DO ÁCIDO RICINOLÉICO**	100	100

^{*}Estima-se que o valor médio de n seja 2 (tetrâmero)

^{**}Estima-se que o valor médio de n esteja entre 4 e 5 (hexâmetros e heptâmeros)

Como pode ser notado, tanto na reação controle como na reação entre AGLM e PE, houve 100% de produção de estolídeos, o que confirma a formação de oligômeros de ácido ricinoléico, com ou sem a presença do PE. Isto demonstra que não houve produção de nenhum derivado deste poliálcool e que o mesmo não participou como substrato na reação. O PE é o único dentre os três poliálcoois utilizados que não se dissolve durante a reação e, além disso, como a análise de RMN foi feita para o sobrenadante obtido após centrifugação para separação da enzima, foi possível perceber que o PE foi o único poliálcool a não aparecer na composição final (Tabela 7). Tal constatação indica que o mesmo, de fato, não se dissolve e que foi separado da reação após a centrifugação e que sua concentração no meio reacional é ínfimo não se tornando um substrato acessível para a enzima. Isso pode ser confirmado também nas reações realizadas com a RM-IM e com a CALB nas quais nenhum éster foi formado na reação com o PE, mostrando também que estas enzimas não são capazes de produzir estolídeos (Figura 21).

Na reação controle as moléculas maiores de estolídeos formadas são hexâmetros e heptâmeros, sendo os maiores oligômeros formados nas quatro reações. A presença dos poliálcoois aparentemente diminuiu o grau de polimerização dos estolídeos, de modo que com o PE, o grau máximo de polimerização foi de tetrâmeros, mostrando que apesar de não reativo, a presença deste poliálcool insolúvel no meio reacional impediu a formação dos estolídeos maiores, devido provavelmente a problemas relacionados ao aumento da dificuldade de transferência de massa (Tabela 7).

Tanto TMP quanto NPG se dissolveram, apesar de não imediatamente, no meio reacional, o que permitiu a formação de alguns ésteres derivados dos poliálcoois. Por outro lado, nas reações com NPG e TMP, também foi notada a produção de estolídeos, porém, na forma de dímeros de ácido ricinoléico e em quantidade superior à dos derivados dos poliálcoois: 65,9 % (NPG) e 70,7 % (TMP) da massa total. Embora tenha havido produção de ésteres dos dois poliálcoois, apenas no caso do NPG, o produto almejado, com todas as hidroxilas esterificadas (dineopentil ricinoleato), foi obtido, contudo em quantidades baixas (17,1% da massa total). A reação com TMP produziu apenas mono e dimetilpropil ricinoleato e não produziu o trimetilpropil ricinoleato (Tabela 7). Tal fato se deve também a menor concentração de ácidos graxos livres disponíveis para a formação dos triésteres uma vez que

todos devem estavar polimerizados na forma de dímeros. Uma possível hipótese levantada para explicar tais resultados seria que a demora na solubilização dos poliálcoois pode ter levado a enzima a iniciar a catálise com o substrato mais facilmente acessível, no caso, o ácido ricinoléico, o que deve ter impedido a formação dos compostos peracilados de poliálcoois. Sendo assim, optou-se por se realizar uma etapa anterior, de solubilização dos mesmos antes do início das reações.

6.12 Efeito da solubilização dos poliálcoois

A partir dos resultados anteriores, foi decidido que uma solubilização prévia do NPG, TMP e PE seria necessária para que, com o aumento de suas disponibilidades no momento inicial da reação, houvesse preferência da enzima pela produção dos compostos derivados dos poliálcoois e não pela formação de estolídeos.

Assim, antes de se adicionar a enzima, o meio reacional foi aquecido até a total solubilização do poliálcool. Para isto, a temperatura da mistura AGLM e NPG, TMP ou PE foi aumentada de 1 em 1 °C, a partir de 40 °C, sob agitação constante, de modo que a máxima temperatura atingida fosse o ponto de solubilização do poliálcool no meio reacional.

Para o PE, apesar do meio ter sido elevado até 150 °C no qual houve alteração da cor do AGLM, não foi possível dissolvê-lo. Desta forma, o PE foi submetido ao seu ponto de fusão (aproximadamente 260 °C) e após a mudança de estado da matéria para o líquido, foi incorporado ao AGLM pré-aquecido a 40 °C, procedimento no qual houve solidificação do poliálcool no momento da mistura. AZIZ e colaboradores (2014) conseguiram reagir o PE com óleo de palma, utilizando catálise química a base de metóxido de sódio, na temperatura de 158 °C. VALERO e GONZALEZ, (2012) reagiram o PE com óleo de mamona numa reação de 2,5 h, a 200 °C, utilizando como catalisador o oxido de chumbo (II). No entanto, ambas reações foram destrutivas ao óleo vegetal e nada foi relatado quanto à estabilidade oxidativa do produto obtido, a qual, possivelmente, foi prejudicada devido às condições de elevada temperatura. Frente a estes relatos, como não foi possível dissolver o PE e os resultados de RMN não mostraram formação de nenhum produto derivado, ele foi descontinuado da tese.

Tanto o NPG quanto o TMP foram solubilizados pelo aquecimento do meio reacional entre 56 e 58 °C e permaneceram neste estado, mesmo com a redução da temperatura para 40 °C. Assim, esses dois poliálcoois foram utilizados nas etapas seguintes do presente Capítulo, na forma solúvel no meio reacional.

A solubilização dos poliálcoois nos permitiu reduzir o tempo de obtenção da conversão de 90% m/m dos AGLM em ésteres, de 96 h para 24 h, sugerindo que a solubilização prévia dos poliálcoois no meio reacional pode ter melhorado as condições de tranferência de massa diminuindo o tempo de esterificação dos AGLM (Figura 26).

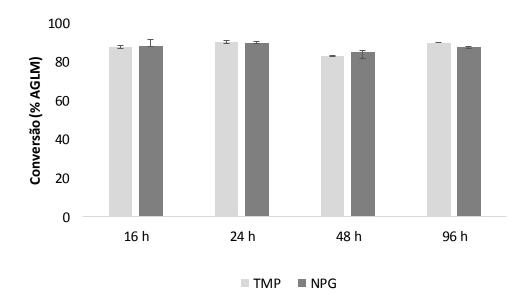


Figura 26 Conversão (% AGLM) da síntese de ésteres com poliálcoois totalmente solubilizados catalisados pela CRL 4% m/m de AGLM. As reações de síntese de biolubrificantes foram conduzidas a 40 °C por 96 h em reatores encamisados com agitação constante. A razão molar AGLM:NPG e TMP foi de 2,5:1 e 3,75:1, respectivamente.

As análises de RMN destes novos produtos obtidos após a pré- solubilização dos poliálcoois ("a" e "b" do tópico 6.2.2) foram realizadas e os componentes principais obtidos estão descritos na Tabela 8.

Tabela 8 Análise de RMN do sobrenadante obtido da centrifugação da reação entre AGLM, CRL (4 % m/m dos substratos) com NPG e TMP (solubilizados previamente) conduzida por 24 h a 40 °C sob agitação mecânica constante.

Substratos	Compostos presentes após a reação	Molar (%)	Massa (%
	NEOPENTILGLICOL (NPG)	17,4	3,9
AGLM e NPG (razão molar 2,5:1)	DINEOPENTIL RICINOLEATO	15,1	21,8
	MONONEOPENTIL RICINOLEATO	25,1	20,9
	DÍMERO DO ÁCIDO RICINOLÉICO	42,4	53,3
	TRIMETILOLPROPANO	4,4	1
_	DIMETILOLPROPIL RICINOLEATO	15,3	18,1
AGLM e TMP (razão molar 3,75:1)	MONOMETILPROPIL RICINOLEATO	7,4	5,5
	TRIMETILOLPROPIL RICINOLEATO	6	10
-	DÍMERO DO ÁCIDO RICINOLÉICO	66,4	65,4

Estes resultados indicam que a etapa de pré-solubilização dos poliálcoois, no meio reacional, contribuiu para o aumento da formação dos ésteres dos poliálcoois, em detrimento da fração de dímeros do ácido ricinoléico. Entretanto, esta diminuição nos dímeros não foi tão significativa, permanecendo como o principal produto da reação (53,3% da massa total usando NPG e 65,4% usando o TMP), enquanto os compostos peracilados foram minoria (21,8% da massa total de dineopentil ricinoleato e somente 10% do trimetilolpropil ricinoleato). Tal fato deixa claro que a CRL tem preferência pelo ácido ricinoléico como substrato e que a não formação de compostos derivados dos polialcoóis não se deve a disponibilidade do mesmo no meio reacional.

6.13 Caracterização dos produtos quanto as suas propriedades lubrificantes

A Tabela 9 mostra as principais características lubrificantes do óleo de mamona, utilizado neste trabalho, em comparação aos produtos obtidos usando o AGLM, produzido pela nossa metodologia, "AGLM próprio" (descrita em 5.2), com poliálcoois previamente solubilizados e, com os produtos obtidos sem poliálcoois, utilizando o AGLM comercial ou o AGLM próprio.

Tabela 9 Propriedades lubrificantes do óleo de mamona, comparado aos produtos das reações de esterificação entre: AGLM próprio com NPG e TMP (razões molares de 2,5: 1 e 3,75: 1, respectivamente); e, sem poliálcoois, usando AGLM comercial e próprio. Todas as reações foram catalisadas pela CRL a 4% m/m de AGLM e estão descritas em 6.5.1 e 6.5.2.

			da reação	io	
Ensaio	Óleo de	AGLM +	AGLM +	AGLM	AGLM
	mamona	NPG	TMP	próprio	comercial
Viscosidade a 40 °C	245.2	172.0	270.1	270.0	400.2
(mm²/s)	245,3	172,0	278,1	379,9	408,2
Viscosidade a 100 °C	10.10	17.00	24.40	41.42	41.54
(mm²/s)	19,19	9 17,60 24,49	24,49	41,43	41,54
Indice de viscosidade	00	111	442	162	154
(IV)	88	111	112	162	154
Estabilidade oxidativa	F0	Γ0	Γ 4	F1	27
(min)	50	50	54	51	37
Ponto de fluidez (°C)	-33	-42	-39	-42	-36
Indice de acidez total					
potenciométrico	3,15	7,3	4,3	40,4	58,4
(mg KOH/g of sample)					

Como se pode notar, as propriedades lubrificantes de todas as amostras foram satisfatórias. No entanto, o óleo de mamona tem índice de viscosidade aquém dos demais, sendo o menor dentre todos avaliados (88). Segundo ERHAN et al. (2002), os óleos vegetais refinados, assim como os óleos vegetais quimicamente modificados (CMVOs), possuem IVs superiores aos óleos minerais, entretanto, os IVs somente se tornarão mais favoráveis às aplicações quando se aproximam de 200, o que normalmente é alcançado com o uso de aditivos.

O ponto de fluidez e a estabilidade oxidativa dos produtos obtidos foram semelhantes/superiores aos relatados anteriormente para biolubrificantes de origem vegetal (Tabela 10). Surpreendentemente, quando apenas estolídeos estavam presentes, o

índice de viscosidade (162 e 154 para AGLM próprio e comercial, respectivamente) foi superior aos resultados para os outros produtos derivados dos poliálcoois. Um índice de viscosidade (IV) como este significa que a viscosidade do fluido não muda muito com a variação da temperatura (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; DA SILVA et al., 2015), o que é desejável para qualquer aplicação de lubrificante.

Tabela 10 Características lubrificantes de produtos encontrados na literatura

Referência	Reação/catalisador	Ponto de Fluidez	Viscosidade a 40°C (cST)	Viscosidade a 100°C (cST)	Índice de viscosidade
ÅKERMAN et al., 2011	Ácido Oléico e TMP/ Lip B de <i>Candida</i> <i>antártica</i>	-42 °C	-	-	-
CAVALCANTE et al., 2014	Ácido Oléico e TMP/ Catalisadores químicos básicos	-42 °C	-	-	≤160
YAO et al., 2010	Óleo de mamona e metanol/ Metóxido de sódio.	-	13,80	2,770	22
AMDEBRHAN et al., 2015	Óleo de mamona e metanol/ Hidróxido de sódio	-5 °C	30,40	-	-
DA SILVA et al., 2015	Biodiesel metílico de mamona e TMP/lipase 34 P de <i>Candida rugosa</i> .	-42 °C	307,6	38,33	148

Por outro lado, o IAT dos estolídeos foi bem maior (40,4 e 58,4 mg KOH g - 1 de AGLM próprio e comercial, respectivamente) do que os produtos NPG e TMP e o próprio óleo de mamona (7,3; 4,3 e 3,15 mg KOH g $^{-1}$ de amostra, respectivamente). Isso pode ser explicado pela característica ácida dos estolídeos livres que está relacionada à ponta carboxílica livre do ácido ricinoléico (vide Revisão bibliográfica, Capítulo 3, item 3.9). Esta acidez, entretando, pode ser diminuída utilizando diferentes estratégias como, por exemplo, esterificação destas moléculas com um álcool simples como poderá ser visto no Capítulo 7.

O uso dos AGLM próprio ou comercial, como substratos para a reação enzimática, gerou produtos com diferentes características. O uso dos AGLM próprio levou a obtenção de um produto com ponto de fluidez mais baixo do que o obtido com o comercial (–42 °C

versus –36 °C) e um aumento de 1,4 vezes na estabilidade oxidativa (51 min versus 37 min). Estas diferenças podem ser atribuídas aos processos de obtenção dos AGLM: o processo enzimático (deste trabalho) preservou a estrutura dos AGLM, enquanto o processo de obtenção dos AGLM comercial, possivelmente hidrólise térmica, produziu subprodutos que afetaram as características do biolubrificante (vide Capítulo 5, item 0).

A avaliação das características dos produtos obtidos e a existência de poucos estudos na literatura sobre a produção de estolídeos por via enzimática tornaram este produto o principal alvo para a continuidade deste trabalho.

Capítulo 7

7 Estudo da produção de estolídeos lubrificantes livres e acabados

Neste Capítulo, estão descritos os estudos da obtenção de estolídeos (anteriormente denominado reação controle) e sua caracterização para os diferentes graus de polimerização do produto. Além disto, também foram realizados estudos preliminares para a produção de estolídeos acabados utilizando os álcoois etanol e 2-etil-1-hexanol. Para isto, foi utilizada, além da metodologia descrita abaixo, o tópico 4.2.1 e 4.2.2, bem como o processo de obtenção dos AGLM descrito no Capítulo 5.

7.1 Esterificação dos AGLM

7.1.1 Efeito da adição de água e cinética da produção de estolídeos

Estudou-se, inicialmente, o efeito da água na reação de produção de estolídeos, em duplicatas biológicas para cada condição testada. Em 12 g de AGLM (contendo 88% de ácido ricinoléico) foram adicionados 1, 3, 5, 10 ou 15% m/m de água, após agitação e a mistura ficar homogênea, visualmente, foram adicionados 0,48 g de CRL (4% m /m), dando início a reação. Alíquotas foram retiradas em 24 e 120 h de reação que foi conduzida em reatores encamisados, mantidos a 40 °C, sob agitação magnética constante. As alíquotas foram centrifugadas (10,000 rpm por 5 min) e os sobrenadantes foram estocados a -20 °C até serem analisados quanto ao seu teor de ácidos livres por titulação.

Na melhor condição de concentração de água no meio reacional foi realizada uma cinética de produção de estolídeos. O acompanhamento do consumo do substrato (ácido ricinoléico) foi realizado pelo teor de acidez de (pelo método titulométrico seção 4.2.1) e consumo de acido ricinoléico (g/100 g ou % m/m de amostra- análise de CG descrito no item 7.6). O perfil de tamanhos dos estolídeos foi avaliado por Cromatografia de exclusão de

tamanho (GPC, item 7.3.2) e o tamanho da maior fração de estolídeos foi calculado pelo número de estolídeo (NE, item 0).

7.1.2 Estudo preliminar da esterificação para formação dos estolídeos acabados

Para a padronização das reações de esterificação do terminal carboxílico, foi realizado um aumento de escala para reatores com 200 g de AGLM, 15 % m/m de água e 4 % m/m de CRL. A reação foi finalizada em 14 h, que corresponde ao tempo reacional no qual o ácido ricinoléico foi quase todo consumido (≤ 4g/100 g amostra). O meio reacional foi centrifugado (10.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante utilizado para as reações de esterificação. O produto obtido foi estocado em geladeira a 4 °C até ser utilizado.

Para a esterificação das terminações livres do estolídeo foram testadas 3 enzimas comerciais: CRL, CALB e RM-IM. Os testes foram realizados utilizando 10 g do estolídeo, 4 % enzima m/m de estolídeo e os álcoois etanol, como álcool primário, e o 2-etil-1-hexanol, como álcool secundário. As reações foram conduzidas em reatores cilíndricos fechados e encamisados a 40 °C, sob agitação magnética constante mantendo a relação 1:1,5. A reação controle, sem álcool, foi realizada com a enzima CRL 4 % m/m e o estolídeo de 14 h para avaliar se a utilização da CRL estaria de fato esterificando os terminais livres ou apenas catalisando a formação de mais estolídeos.

Foram retiradas alíquotas nos tempos de 1, 2, 6 e 24 h, que foram centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min e foram analisadas pelo método titulométrico. A razão molar entre os estolídeos e os álcoois foi calculada a partir do número de moles de NaOH utilizados para neutralizar o produto obtido que corresponde, então, ao número de moles de carboxilas disponíveis no produto. Tal cálculo do número de moles de NaOH e, portanto, do número de carboxilas disponíveis está descrito na Equação 8.

$$n_{NaOH} = [(M \times V)/m_{am})]$$

Equação 8

Sendo:

 $n_{\it NaOH}=$ número de moles de NaOH que corresponde aos COOH livres (mmol/g amostra)

V = volume de NaOH titulado (mL)

M = molaridade da solução de NaOH (mol/L)

 m_{am} = massa de amostra (g)

7.2 Análise do teor de água

O teor de água das alíquotas, provenientes das reações de produção de estolídeos da seção 7.1.1, foi determinado pelo método de titulação coloumétrica utilizando o equipamento Karl-Fisher (BRUTTEL; SCHLINK, 2006).

7.3 Análises de caracterização química dos produtos obtidos.

Os estolídeos produzidos neste Capítulo, foram caracterizados quanto à estrutura química, por ressonância magnética nuclear, que nos permite também determinar o número de estolídeo (NE). O NE proporciona uma estimativa de qual é o estolídeo de maior massa molecular na amostra. Além disso, os estolídeos obtidos foram também avaliados por cromatografia de permeação em gel (GPC) ou cromatografia de exclusão de tamanho (SEC), com o objetivo de determinar o perfil de distribuição dos estolídeos, de acordo com seus tamanhos. Esta metodologia é capaz de discernir os estolídeos formados até a fração de tetrâmeros, pois a partir de pentâmeros, todos os estolídeos eluem em um mesmo pico e foram denominados como pentâmeros (+). Estas análises serão descriminadas nos itens a seguir.

7.3.1 Análise de ressonância magnética nuclear para determinação do número de estolídeo

O NE é a medida direta do tamanho da principal cadeia polimérica/oligomérica de carbono constituinte da amostra e é determinado pela razão entre a integração dos picos -C-O-C-, sinal de 73,5 ppm e -C-O, sinal de 71,5 ppm no espectro de RMN que pode ser visto no anexo ao final deste documento. Para determinação do número de estolídeo das alíquotas obtidas de 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 e 24 h da cinética de produção de estolídeos (item 7.1.1), as análises de RMN de ¹³C foram realizadas no equipamento Agilent 400MR (9,40 T de campo magnético), em solução de CDCl₃ ou mistura de CDCl₃ à temperatura de 25 °C, na concentração de 20% em massa, em sonda de 5mm. Foram utilizadas as seguintes condições experimentais:

13C

Frequência: 100,5 MHz

Janela espectral: 25,0 kHz

Tempo de aquisição:1,3 s

Pulso: 13,4 μs (90°)

Intervalo entre pulsos: 10 s

Número de transientes: 2048

Núcleo desacoplado: ¹H

Modo do desacoplador: NNY

Processamento:

Line broadening: 1,0 Hz

7.3.2 Análise de determinação do perfil de massa molar das amostras de estolídeos por GPC

A análise de GPC foi utilizada para determinação do perfil de tamanhos dos estolídeos para as alíquotas de 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 e 24 h da cinética de produção de estolídeos (seção 7.1.1). O sistema cromatográfico empregado foi a bomba isocrática Agilent 1200, equipado com três colunas em série (Styragel Column, HR 2; 5 μm; 7,8 mm × 300 mm;

500 – 20 K, THF [WAT044237]; Styragel Column, HR 1; 5 μ m; 7,8 mm × 300 mm, 100 – 5 K; THF [WAT044234]; e Styragel Column, HR 0,5; 5 μ m, 7,8 mm × 300 mm, 0 – 1 K, THF [WAT044231]). Aplicou-se 20 μ L de amostra em uma alça de injeção, que foi injetada automaticamente, por injetor Waters 2707. As amostras foram então recebidas pelo detector ELSD 2000ES a 40 °C, com fluxo de N₂ de 1,6 L/min. O eluente utilizado foi o tetrahidrofurano (THF) com fluxo de 0,6 mL/min e o tempo total de análise foi de 55 min. Para comparação e identificação dos constituintes das amostras, foi feita uma curva de calibração preparada com padrões de poliestireno (PSS) cobrindo as massas moleculares de 580 a 66000 Da (PSS - M_w): PSS1 – 22000 e 1680; PSS2 – 11600 e 980; PSS3 – 28500 e 2450; PSS4 – 10100 e 3250 PSS5 – 66000, 7000 e 580. A massa molar dos estolídeos mais pesados e mais leves foi determinada pela extrapolação da curva de calibração.

7.4 Avaliação das propriedades dos estolídeos livres em diferentes tempos após cinética

Para caracterizar os produtos formados, quanto às propriedades lubrificantes, foi realizado um aumento de escala para reatores com 210 g de AGLM, 15% m/m de água e 4% m/m enzima. As reações foram retiradas em tempos de 6, 14 e 20 h, foram centrifugadas (10.000 rpm, 10 min). O sobrenadante foi diluído em acetato de etila e a ele foi adicionado 10% m/m de sulfato de sódio anidro, para retirada de qualquer resquício de água. A mistura foi deixada agitando por 30 min e depois filtrada em papel de filtro à vácuo para posteriormente ser recuperada em rotaevaporador (PolyScience®). O produto obtido foi estocado em geladeira a 4 °C até ser caracterizado.

7.5 Avaliação das características dos estolídeos acabados

7.5.1 Produção do estolídeo com 14 h de reação

Primeiro foi produzido o estolídeo livre em 14 h de reação para que ambos estolídeos acabados partissem de um mesmo óleo básico. Para isso, 600 g de AGLM, 15 % m/m de água

(90 g) foram transferidos para um reator encamisado aberto mantido a temperatura de 40 °C. Quando este meio reacional chegou à temperatura de 40 °C, sob agitação, foi dado início a reação com a adição de 4 % m/m enzima (24 g). A reação foi retirada em 14 h, centrifugada (10.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante foi armazenado em geladeira à 4 °C até ser utilizado para as reações de esterificação com os álcoois: etanol e 2-etil-1-hexanol, descritas no tópico 7.5.2.

7.5.2 Reações de esterificação do terminal carboxílico para caracterização

Para estas reações, a quantidade de álcool foi calculada de modo a manter a razão molar 1:1,5 (COOH livre: álcool). O cálculo do COOH livre está na seção 7.1.2. Foi utilizado 200 g do estolídeo com acidez total (dosada pelo método titulométrico) à 28 e 4% m/m de CALB (8,0 g). A reação foi iniciada com a adição de álcool e os reatores encamisados a 40 °C foram mantidos fechados sob agitação constante a 200 rpm garantindo que a enzima estivesse em contato com todo o meio reacional. A reação foi retirada em 6 h para o caso do etanol e em 24 h para o 2-etil-1-hexanol, centrifugada (10.000 rpm, 10 min) e os sobrenadantes foram secados em rotaevaporador com banho a 60 °C a 72 mbar por, aproximadamente, 1 h. O óleo obtido foi estocado em geladeira a 4 °C até ser caracterizado.

7.6 Análise do conteúdo de ácido ricinoléico livre no meio reacional por cromatografia gasosa (CG)

Esta análise foi desenvolvida e utilizada neste Capítulo e no seguinte (8) tanto na determinação do conteúdo de ácido ricinoléico livre (ARL), remanescente no meio reacional, durante a síntese de estolídeos, quanto para auxiliar na compreensão da oligomerização do estolídeo. O desenvolvimento desta metodologia permitiu a discriminação da formação do estolídeo pela incorporação do ARL ou pela conjugação de estolídeos menores. Além disto, esta análise possibilitou a observação dos demais ácidos graxos livres presentes no meio reacional bem como sua diminuição ao longo da reação por incorporação à estrutura dos estolídeos.

O presente método foi desenvolvido com base na derivatização analítica dos ARLs pela sua esterificação com isopropanol para a quantificação dos mesmos no meio reacional (g/100 g amostra, que será referido como % m/m), e também, baseado na esterificação de ácidos graxos livres por catálise ácida (LEPAGE; ROY, 1986), com adaptações. No presente trabalho, foi utilizado, como agente de derivatização, o isopropanol no lugar do metanol, presente no método original (LEPAGE; ROY, 1986), com o objetivo de melhorar as propriedades cromatográficas do derivado (WOLFF; BAYARD; FABIEN, 1995) e permitir a solubilização completa dos ARLs. Além disso, o tempo e a temperatura do método original foram reduzidos para restringir à esterificação apenas aos ácidos graxos que permanecem livres na amostra, sem transesterificar os estolídeos formados.

7.6.1 Derivatização do ácido ricinoléico livre

Quinze microlitros dos sobrenadantes provenientes das reações de produção dos estolídeos foram pipetados em tubos já pesados (tara) de vidro, com tampas rosqueadas revestidas de politetrafluoretileno (PTFE). A água residual presente na amostra foi separada e evaporada das mesmas pela adição de 100 μL de etanol, secos por vapor de nitrogênio e, após este procedimento, os tubos foram pesados novamente para determinação do peso das amostras já livres de água. Foi preparada uma solução padrão interno de ácido heptadecanóico (C17:0) a 0,625 mg/mL em isopropanol. Desta solução, foram adicionados às amostras 2,4 mL /tubo, totalizando 1,5 mg de ácido heptadecanóico/tubo. Em seguida, a cada tubo foram adicionados 0,6 mL de n-hexano. Os tubos foram, então, homogeneizados em vortex até a total solubilização da amostra. Após este procedimento, 300 μL do catalisador da esterifacação do isopropanol com os ácidos ainda livres na amostra, o cloreto de acetila, foram, gota a gota, adicionados aos tubos em capela, enquanto a mistura era gentilmente agitada. Os tubos foram fortemente fechados e as amostras foram então submetidas à reação (isopropilação), sob agitação, a 80 °C, por 20 min, em um banho termostatizado (Kötterman). Após a reação, os tubos foram resfriados em água e 3,0 mL de uma solução 15% KHCO₃, em água deionizada, foram lentamente adicionados para parar a reação e neutralizar a mistura. Os tubos foram então submetidos à centrifugação, a 2000

rpm, por 10 min e uma alíquota de 300 μL da fase superior, rica em hexano, foi retirada e

estocada em tubos de vidro (vials), a 20 °C, até serem analisadas no CG. O branco reacional

foi realizado em paralelo com a adição de água deionizada no lugar da amostra.

7.6.2 Análise dos ésteres isopropilados de ácidos graxos por cromatografia gasosa

Os ácidos graxos isopropilados foram analisados em um CG (GC-2010; Shimadzu,

Japan) equipado com uma coluna fast, capilar, composta de polietilenoglicol (Omegawax

100; 15 m×0,1 mm×0,1 μm; Sigma, São Paulo, Brasil). As condições utiizadas foram: 260 °C;

gás de arraste: hélio a 3,0 mL·min⁻¹; volume de injeção de amostra: 1,0 μL com razão de split

1:200. A temperatura inicial da coluna foi 140 °C aumentando numa taxa de 60 °C min⁻¹ até

210 °C, temperatura na qual se manteve por 2 min; posteriormente ela foi aumentada à 20

°C.min⁻¹ até atingir 260 °C mantido por 1 min e finalmente, aumentou-se à 10 °C min⁻¹ até

280 °C permanecendo constante por 2 min totalizando tempo de corrida de 10,67 min. A

temperatura do detector de ionização em chama foi 280 °C. O percentual de ácido

ricinoléico foi calculado segundo a Equação 9.

 $AR = 100 \times \frac{(MPI \times AR)}{(MA \times API)}$

Equação 9

Sendo:

AR: ácido ricinoléico (g/100 g amostra, % m/m);

MPI: Massa do padrão interno (g);

AR: Área do pico do ácido ricinoléico;

MA: massa de amostra(g);

API: Área do pico do padrão interno.

133

Os resultados provenientes das triplicatas analíticas de cada duplicata biológica foram comparados entre si pela utilização do teste-t com 95% de confiança. O percentual de conversão do ácido ricinoléico é uma medida da diminuição do ácido ricinoléico no meio e foi calculado pela Equação 10.

$$CAR = 100 \times \frac{(AR_i - AR_f)}{AR_i}$$

Equação 10

Sendo:

CAR: Conversão do ácido ricinoléico (%);

AR_i: Teor inicial de ácido ricinoléico (% m/m de amostra);

AR_f: Teor final de ácido ricinoléico (% m/m de amostra);

A identificação do pico correspondente ao ácido ricinoléico foi realizada pela comparação com a solução padrão comercial de ácido ricinoléico, adquirida da Sigma-Aldrich, que foi submetida a mesma análise descrita em 7.6.1.

7.7 Resultados

7.8 Efeito da concentração de água na produção de estolídeos pela CRL

No Capítulo anterior (6), foram feitos estudos preliminares da quantidade de água adicionada no meio reacional para a produção de derivados de poliálcoóis e apesar de não ter havido influência para a utilização do NPG ou do TMP, no caso do PE, sua adição, primeriamente pareceu positiva e nesta reação foi constatado por RMN a presença de 100% de estolídeos como produto final. Na literatura, os poucos estudos relacionados a produção de estolídeos por via enzimática estão relacionados a adição de água no meio reacional,

sendo esta menos necessária, no caso da utilização de enzimas imobilizadas (BÓDALO et al., 2008; YOSHIDA et al., 1997), do que no caso de enzimas livres (BÓDALO-SANTOYO et al., 2005). De acordo com os resultados obtidos em BÓDALO-SANTOYO et al. (2005), 144,000 ppm de água [14,4% água (m/m)] seria a concentração ideal para a produção de estolídeos nas condições utilizadas neste estudo. Para iniciarmos o estudo da reação de produção de estolídeos foi realizado então a comparação entre a não adição de água com a adição de 1, 3, 5, 10 e 15% (m/m) de água nos quais, além da acidez (4.2.1), foi acompanhado também o teor de água das amostras 7.2), conforme pode ser observado na Tabela 11.

Tabela 11 Acidez total e teor de água (%) à 0, 24 e 120 h das reações de formação de estolídeos com adições de água variando de 1-15% (m/m).

Acidez (% AGLM) ¹									
	Controle*	1% **	3%**	5% **	10% **	15%**			
0 h	100	100	100	100	100	100			
24 h	62 ± 0,2 ^a	35 ± 0,5 ^b	35 ± 13,7 ^b	28 ± 2,3 ^b	33 ± 0,5 ^b	29 ± 2,3 ^b			
120 h	29 ± 1,3 ^{a,A}	24 ± 1,4 ^{a,b,A}	20 ± 4,2 ^{b,A}	17 ± 0,2 ^{b,A}	20 ± 0,1 ^{b,A}	$18 \pm 2,6^{b,A}$			
Teor de água (ppm)									
	Controle*	1% **	3%**	5% **	10% **	15%**			
0 h	0	10000	30000	50000	100000	150000			
24 h	3124,5	2932,7	2198,0	2467,0	3089,1	3344,6			
120 h	2276,1	2199,0	2013,4	1890,0	2513,7	2495,0			

^{*}Sem adição de água **m/m de água

Para todos os testes foi considerado o nível de significancia p<0,05; sendo a média (± desvio padrão) seguido de letras diferentes quando a diferença for estatisticamente diferente e letras iguais quando forem estatisticamente iguais.

¹Todos os valores foram convertidos para um inicial de 100% de acidez para melho comparar todas as amostras, uma vez que somente o conteúdo de água que varia dentre as amostras.

^{a,b} Letras minúsculas se referem ao teste de Turkey para comparações entre as diferentes condições testadas (colunas).

^ALetras maiúsculas se referem ao teste t de Student realizada dentro do mesmo tempo 120 h (linha) para avaliar se os resultados são iguais estatisticamente.

A acidez total das amostras diminuiu de acordo com o aumento do tempo reacional o que representa a conversão dos AGLM em estolídeos por esterificação, conforme já demonstrado no Capítulo anterior (6). No entanto, desta vez, o teor de água da reação foi variado de 1-15% (m/m), sendo o último valor escolhido devido a proximidade com a concentração apontada como a melhor em (BÓDALO-SANTOYO et al., 2005) para enzimas livres.

Os resultados observados na Tabela 11 sugerem que o efeito principal da adição de água foi o de aumentar a taxa da reação, bem visível ao se comparar o resultado, em 24 h de reação, da condição sem adição de água com qualquer um dos demais com adição de água. Dentro dos valores estudados, não houve efeitos negativos da adição de água nos rendimentos finais da reação. Os efeitos positivos, observados nas primeiras 24 h de reação, não persistem durante o curso reacional, uma vez que a acidez final das reações de 1-15% m/m de água não varia tanto em 120 h, sendo o resultado do controle estatisticamente igual ao obtido com 1% de adição de água.

Esta diferença, no entanto, é clara em 24 h, tempo reacional no qual obtive mos 40% de redução da acidez total, na reação em ausência de água, o que representa produtividade de 1,6% AGLM consumido/h. Nas reações com adição de água a redução de acidez foi de 3% AGLM consumido/h, um aumento de aproximadamente 2 vezes no consumo dos AGLM (substrato) na reação. Desta forma, a concentração de 15% m/m água foi escolhida para experimentos posteriores. Esta concentração levou a um produto com maior viscosidade (observação visual) e melhorou a dispersão da enzima no meio reacional, além de haver relatos na literatura indicando esta condição como preferencial para a produção de estolídeos.

BÓDALO-SANTOYO *et al.*, (2005) investigaram diversas concentrações iniciais de água no meio reacional usando uma lipase comercial livre de *Candida rugosa*. Os autores também realizaram as reações a 40 °C, no entanto, para manter a temperatura e auxiliar a evaporação, eles utilizaram uma corrente de ar quente passando pelo meio reacional. Ao final de 24 h de reação, foi observado um teor de água de aproximadamente 2500 ppm em todas as amostras. Neste trabalho, foi utilizado um reator cilíndrico aberto, que permitiu a evaporação espontânea de água. Em 24 h de reação, teores de 2000 – 3400 ppm foram

encontrados em todos os meios reacionais, mesmo com a variação da concentração de água inicial de 1 a 15% m/m (Tabela 11). Isto pode sugerir que a evaporação espontânea ocorre em todos os sistemas, independente do teor de água inicial, até atingir um possível equilíbrio.

7.9 Cinética de formação de estolídeos

Diferentemente dos processos de esterificação convencionais, os produtos formados, neste caso, apresentam um terminal carboxílico e uma hidroxila livre, permitindo, desta forma, o aumento do grau de polimerização dos estolídeos. Assim, a conversão do ácido ricinoléico livre (ARL) em estolídeo não pode ser determinada apenas pela acidez total da amostra como foi realizado em BÓDALO-SANTOYO et al., (2005) e YOSHIDA et al., (1997), uma vez que, mesmo que a conversão em estolídeos seja de 100%, a acidez proveniente do terminal carboxílico livre sempre será detectada e quantificada. Sendo assim, um método rápido de detecção do ARL por cromatografia gasosa foi desenvolvido, em cooperação com o laboratório de Bioquímica Nutricional e de Alimentos (LBNA), para acompanhamento do consumo do ARL ao longo da reação. Figura 27 ilustra a cinética de diminuição de acidez e consumo de ácido ricinoléico ao longo de 24 h de reação.

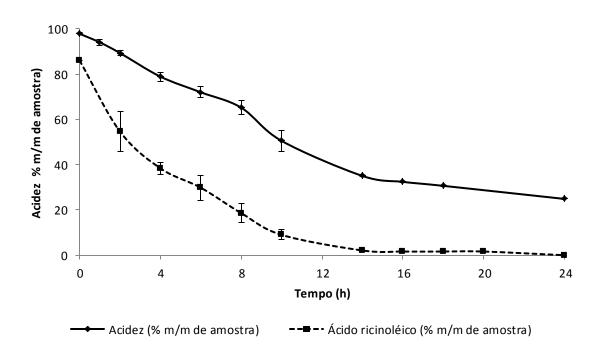


Figura 27 Consumo da acidez total do meio reacional e ácido ricinoléico livre durante a cinética de produção de estolídeos. O substrato utilizado foi AGLM e a reação foi realizada com a adição de 15% m/m de água e 4% m/m de CRL. Alíquotas foram retiradas de 2-24 h de reação, centrifugadas (10.000 rpm, 5 min), e os sobrenadantes foram analisados quanto à acidez total pelo método titulométrico e ARL por CG (resultados foram expressos em % m/m amostra).

Em 14 h a acidez da reação atinge cerca de 30% m/m, entretanto o ARL foi quase totalmente consumido do meio reacional atingindo valores residuais (<4 g/100g de amostra). Após 14 h de reação a acidez continua a diminuir, embora com uma taxa menor, o que sugere que deve ocorrer um rearranjo dos estolídeos já formados conduzindo a formação de moléculas maiores (reação de polimerização).

BÓDALO-SANTOYO et al., (2005) investigarm a produção de estolídeos usando lipase livre de *Candida rugosa* e ácido ricinoléico na concentração de 99% e obteve, depois de 48 h de reação uma acidez de 32,5% m/m, valor similar ao obtido, neste trabalho, em apenas 14 h de reação (Figura 27). A maior produtividade obtida neste trabalho (3,4 vezes maior) pode estar relacionada a utilização de ARL de diferentes procedências. Os autores utilizaram ácido ricinoléico obtido por via química, cujos contaminantes podem prejudicar a reação (GRECO-DUARTE et al., 2017). Neste trabalho, foram utilizados AGLM provenientes da hidrólise enzimática em condições amenas de temperatura (Capítulo 5). Além disso, há modificações

no processo de obtenção dos estolídeos no que diz respeito ao tipo de agitador utilizado (agitador em hélice com 3 pás versus agitação magnética no nosso trabalho), sistema de aquecimento (corrente de ar quente versus reatores encamisados e aquecidos com livre evaporação) e/ou volume/tamanho do reator utilizado.

Além do ARL, os demais AGLM também diminuíram ao longo da reação. Os cromatogramas da análise de detecção de ARL, referentes ao tempo inicial e após 18 h de reação podem ser vistos na Figura 28 Figura 29, respectivamente.

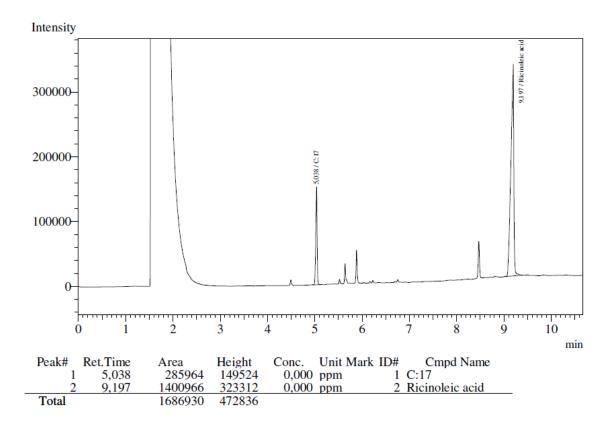


Figura 28 Cromatograma da reação de formação de estolídeos no ponto inicial (0 h) correspondendo a composição dos AGLM. Os picos assinalados correspondem ao padrão interno C:17 (*Peak* 1) e ao ácido ricinoléico (*Peak* 2). Os demais picos presentes no cromatograma pertencem aos demais ácidos presentes nos AGLM.

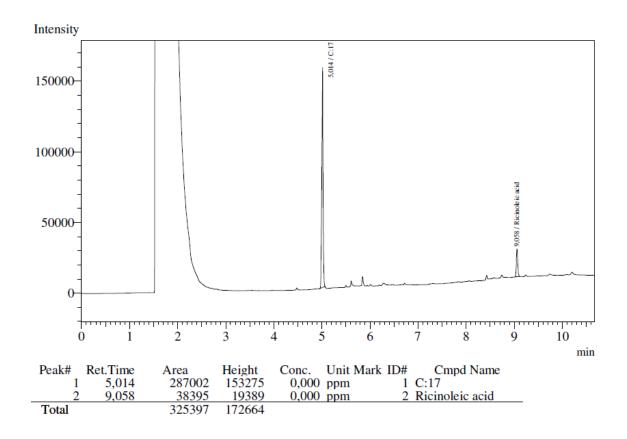


Figura 29 Cromatograma do ponto de 18 h da reação de formação de estolídeos. Os picos assinalados correspondem ao padrão interno C:17 (*Peak* 1) e ao ácido ricinoléico (*Peak* 2). Se observa que os demais ácidos presentes, assim como o ácido ricinoléico diminuem, indicando que todos os AGLM foram utilizados na formação de estolídeos seja como terminadores das cadeias poliméricas, na porção alcoólica.

Na Figura 28 se observam os demais picos correspondentes aos ácidos graxos presente nos AGLM, além do ácido ricinoléico. Na Figura 29 é possível notar a diminuição destes picos, o que indica que eles estão sendo incorporados a reação formando estolídeos monoacabados (CERMAK; ISBELL, 2002b). Como a reação entre terminais carboxílicos dos AGLM e do estolideo não ocorre naturalmente pela catálise enzimática, estes demais ácidos foram utilizados como agentes terminadores, na hidroxila do carbono 12, presente no primeiro ácido ricinoléico da cadeia dos estolídeos livres (Figura 31). No entanto, como estes estolídeos monoacabados ainda estão livres no terminal carboxílico, ainda é possível alongar a cadeia polimérica, até que a capacidade da enzima atinja seus limites, limite este que ainda não é conhecido, uma vez que esta reação só foi conduzida até 24 h.

É importante ressaltar que como 88% dos AGLM é de ARL, 12% são os demais ácidos vistos na Tabela 5. Sendo assim, 12% das moléculas de estolídeos formadas serão monoacabadas, o que ainda é um percentual pequeno. Desta forma, estes produtos continuarão a serem chamados de estolídeos livres ou somente estolídeos por serem a maior porção da amostra.

7.9.1 Relação entre a acidez e a concentração de ácido ricinoléico

Apesar da curva da acidez e do ARL não serem diretamente proporcionais, existe uma relação não linear, semelhante a uma exponencial, entre estas duas medidas experimentais (Figura 30 B). A linearização destes medidas está ilustrada na Figura 30 A.

A análise da regressão linear obtida neste gráfico permitiu obter um modelo bastante ajustado que poderá ser utilizado para estimar, por extrapolação, a quantidade de ARL, presente no meio reacional, a partir da acidez total da amostra. No entanto, esta extrapolação só pode ser realizada para valores abaixo de 70% (% m/m amostra) (Tabela 12) que é quando o desvio padrão (DP) entre o observado e o predito é inferior a de 10%. Este modelo continuará a ser utilizado durante os demais testes visando a sua validação. Uma vez validado, ele pode auxiliar a implementação do uso dos estolídeos em aplicações industriais pela simplicidade analítica.

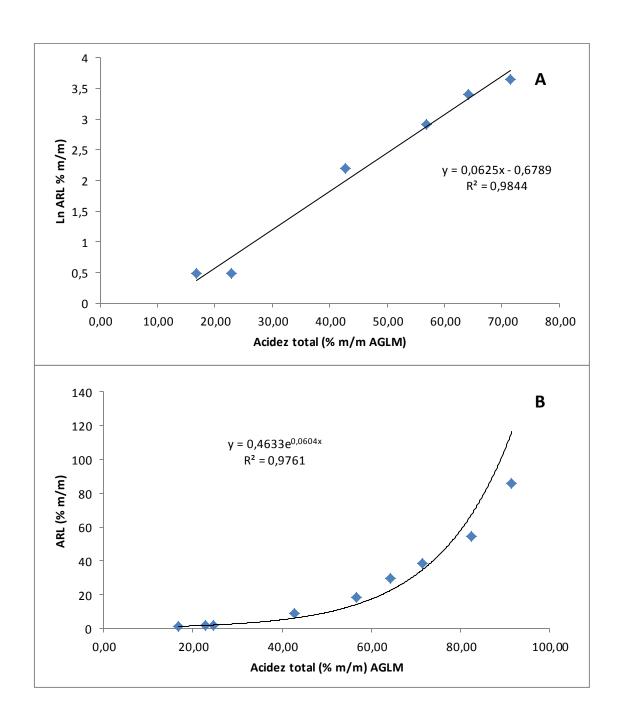


Figura 30 Associação entre o ácido ricinoléico livre (ARL) e a acidez total da amostra. Os gráficos mostram a relação não linear entre as variáveis (A); e a regressão linear logarítma transformada das curvas de ácido ricinoléico livre (ARL) e acidez total (AT) (In ARL=0,0625AT-0,6789; R²= 0,9873; P< 0,0001).

Tabela 12 Relação entre valores de ARL observados, por meio da análise de detecção dos ARL, e preditos pela equação da regressão linear logarítma (InARL=0,0625AT-0,6789) com base na acidez total da amostra.

Tempo	Acidez total (g/100g amostra)	ARL observado	Ln ARL	ARL predito	DP
	amostra)	(~/100 ~)			
		(g/100 g)			
0	91,58	86	5,22	185,85	70,61
2	82,43	54,62	4,60	99,39	31,65
4	71,57	38,38	3,86	47,29	6,30
6	64,23	29,80	3,35	28,62	0,83
8	56,81	18,57	2,85	17,22	0,95
10	42,77	8,97	1,89	6,60	1,68
16	24,59	1,62	0,64	1,90	0,20
18	22,87	1,63	0,52	1,69	0,04
24	16,83	1,1	0,11	1,12	0,01

7.9.2 Alongamento do estolídeo durante a reação

Mesmo conhecendo a curva de consumo do ARL e diminuição de acidez não é possível prever o tamanho médio dos estolídeos e garantir que houve o consumo total dos AGLM (ARL e demais ácidos presentes). Nossos resultados apontaram para um estolídeo cujo grau de polimerização foi de hexâmeros/ heptâmeros em 96 h de reação (GRECO-DUARTE et al., 2017, Capítulo 6). No entanto, estes cálculos são indicativos da distribuição de tamanhos dos estolídeos que são os principais responsáveis pelas características lubrificantes das amostras.

Uma forma simples e rápida de saber o tamanho dos estolídeos é por meio da análise de RMN que pode fornecer o número de estolídeo (NE). Este número é definido como o número médio dos ARL adicionados à primeira molécula de AR formadora do estolídeo (CERMAK et al., 2013). O sinal da ligação éster nos oligômeros pode ser utilizado como instrumento para caracterizar a estrutura do estolídeo (CERMAK; ISBELL, 2002b). Desta forma, o NE pode ser obtido pela razão entre a área do sinal -C-O-C-, 73,5 ppm (Figura 31 – #1) e -C-OH, 71,5 ppm (Figura 30 - #2) nos espectros de RMN, que poderão ser vistos nos anexos deste documento. Assim, a ligação éster formada pela reação entre a porção carboxílica de um ARL com a hidroxila de outro ARL pode ser utilizada com a finalidade de determinar o grau de polimerização da maior fração de estolídeos presente no produto.

Figura 31 Representação das ligações éster utilizadas para calcular o NE: -C-O-C- como #1 e -C-OH como #2.

Desta forma, com a finalidade de conhecer o perfil de distribuição do produto obtido pela reação de formação de estolídeos, com maior precisão, decidiu-se analisar por GPC e NE as diferentes alíquotas provenientes da cinética de formação de estolídeos (Figura 32). Para isto, a avaliação do perfil de massa molar e o grau de polimerização do estolídeo formado foi realizada em diferentes tempos: 2, 4, 6, 8, 10, 14, 20 e 24 h pela análise de NE (Figura 32 A) e SEC ou GPC (Figura 32 B).

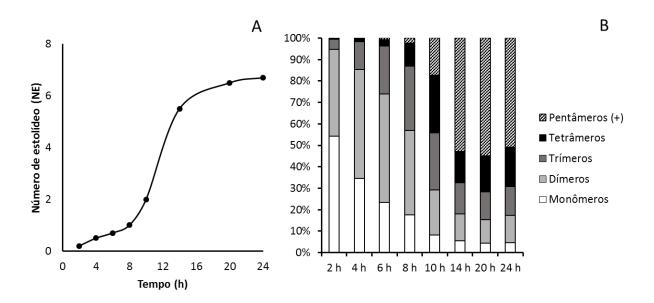


Figura 32 Cinética da reação de formação de estolídeos, avaliado pelo NE (A) e perfil de polimerização (B). O NE aumentou de forma não-linear com o tempo sendo o aumento de 8 às 14 h proeminente com relação aos demais. Cada tempo reacional representou um perfil diferenciado de estolídeos livres sendo a partir de 14 h predominante a fração de pentâmeros (+) cujo NE auxilia na determinação da maior molécula de estolídeos formada.

A Figura 32A mostra a evolução do NE durante a reação. Se o ARL for um dos principais componentes da amostra, o NE estará entre 0 e 1, fornecendo uma taxa de conversão dos ARL em estolídeos. No entanto, se NE=1, teremos dímeros como a principal fração; se NE=2, a fração de trímeros é uma das que possui maior concentração; se NE=3, o mesmo ocorre para os tetrâmeros e assim por diante.

A Figura 32B demonstra o perfil das moléculas de estolídeos em cada um dos tempos reacionais. Após 2 h de reação, quando cerca de 50% do AGLM foi consumido, é possível encontrar um produto composto de uma mistura de estolídeos de diferentes polimerizações: dímeros (40,5%), trímeros (4,7%) e tetrâmeros (0,5%) e ainda, alguns pentâmeros (+) podem ser visualizados (0,1%). Neste tempo de reação, o produto ainda contém elevada proporção de ARL dentro da fração de monômeros, uma vez que o NE é de 0,2.

Após 4 h de reação, a taxa de consumo de ARL diminui e a concentração de dímeros atinge 50,8%. A porcentagem de trímeros cresceu tornando-se 13,1%, e os tetrâmeros

atingiram 1,2%. A fração de pentâmeros (+), apesar de ter aumentado, ainda permanece baixa, 0,4%. A fração de monômeros ainda tem grande quantidade de ARL, uma vez que o NE é de 0,5.

Após 6 h de reação, a fração de dímeros apesar de diminuir continua como o composto principal na mistura e o NE atinge o valor de 0,7 indicando que dos 23,4 % de monômeros (AGLM) a maior porcentagem ainda é de ARL. Estes fatores sugerem que não somente o aumento da fração de trímeros, para 22,3%, ocorreu pela conjugação de dímeros e ARL, como o aumento da fração de tetrâmeros (3,1%) pode ter ocorrido pela conjugação de dímeros ou de trímeros e ARL. Neste tempo a fração de pentâmeros (+) atinge 0,7%.

Em 8 h de reação, 17,6% dos AGLM ainda estão presentes, porém com menor quantidade de ARL, uma vez que o NE é igual a 1,0 indicando, também, que os dímeros ocupam a fração majoritária apesar de ter diminuído para o valor de 39,4%. A porcentagem de trímeros aumentou moderadamente para 29,9%, sendo taxa de crescimento dos tetrâmeros e pentâmeros (+), aproximadamente 3,4 vezes maior do que às 6 h atingindo 10% e 2,4%, respectivamente.

Em 10 horas de reação, os trímeros e os tetrâmeros se tornam os principais componentes da mistura de reação (26,6% e 26,9% cada). O que pode ser observado pelo NE igual a 2,0. Os maiores estolídeos tornam-se 17,3% do produto, enquanto há a dimiuição dos dímeros (21,1%) e monômeros (8%).

Entre 8 e 14 h de reação, o NE aumenta exponencialmente (passando de 1 a 5,5) e o aumento da polimerização do estolídeo para tetrâmeros e pentâmeros (+) é evidente. O ARL não está mais acessível no meio reacional (Figura 27), tal fato torna claro que a enzima deve ser capaz de catalisar a reação de esterificação, tanto para o ARL, como pequenos estolídeos, formando moléculas maiores por meio da reação de polimerização, uma vez que a fração de pentâmeros (+) se torna maior após 14 h de reação.

Entre 14 e 24 h de reação, as mudanças foram muito pequenas, no entanto, comparado com os tempos inferiores, todos os compostos diminuíram, exceto os maiores estolídeos. Em 14 h, os pentâmeros (+) atingiram 52,8%, sendo em sua maioria hexâmeros e heptâmeros. Entre 20 e 24 h, as frações abaixo do nível dos pentâmeros (+) aumentam -

embora não de forma significante — possivelmente, devido à hidrólise de alguns dos estolídeos, uma vez que ainda há água disponível na reação (~3000 ppm, Tabela 11). Tal fato sugere que estes estolídeos menores são adicionados aos maiores estolídeos causando o aumento do NE, de 6,5 às 20 h para 6,7 às 24 h, e o correspondente aumento na fração de heptâmeros e de octâmeros.

Nenhum trabalho descrito na literatura descreve a obtenção de octâmeros independente do tipo de catálise. Normalmente, a literatura descreve a obtenção de dímeros (NE=1) e no máximo de tetrâmeros (TODEA et al., 2015). Estes autores fizeram o estudo da seletividade de enzimas para a produção de estolídeos, utilizando 3 tipos de hidroxiácidos comerciais e a catálise ocorreu em meio orgânico composto por tolueno, em 24 h de reação na temperatura de 40 °C. Os autores encontraram resultados com maiores conversões dos ácidos graxos livres (91,6 %) utilizando o ácido-16-hidroxi-hexadecanóico (16HHDA) obtendo dímeros, trímeros e tetrâmeros utilizando as enzimas *C. antarctica* B e lipase de pâncreas de porco. Além disto, utilizando o ácido ricinoléico, os autores obtiveram o máximo de conversão (33,2%) para a as enzimas *C. antarctica* B, sendo o maior produto encontrado nesta reação os dímeros; e, utilizando a enzima de *P. fluorescens* formou-se até trímeros com 31,5 % de conversão.

7.10 Estudo preliminar da esterificação para formação de estolídeos acabados

Estolídeos provenientes da produção via catalise química vem sendo descritos na literatura como um produto que, quando comparado a outros biolubrificantes, como os obtidos de poliálcoois, tem as maiores estabilidades oxidativas e as melhores características mesmo em baixas temperaturas como os menores pontos de fluidez; melhor ação lubrificante e, para sua produção, podem ser utilizados diversos óleos vegetais e as reações normalmente usam temperaturas amenas para catalise química (< 100 °C) (GARCÍA-ZAPATEIRO) et al., 2013b; GARCÍA-ZAPATEIRO; VALENCIA; FRANCO, 2014; MCNUTT; HE, 2016; SYAHIR et al., 2017).

No entanto, os estolídeos apresentam ainda um terminal carboxílico livre o que confere a estes, característica ácida, que deve ser evitada na formulação de um lubrificante.

Cada estolídeo livre possui, além deste terminal ácido, uma hidroxila livre no carbono 12 do primeiro ácido graxo formador do estolídeo e esta hidroxila poderia também ser responsável pela diminuição da estabilidade oxidativa do produto (AZEVEDO; LIMA, 2001; YAO et al., 2010). No tópico 7.9, foi demostrado que os demais ácidos presentes na mistura de ácidos graxos livres de mamona (AGLM), diferentes do ácido ricinoléico, foram consumidos ao longo da reação, indicando que 12% dos estolídeos formados são monoacabados.

CERMAK, BRANDON e ISBELL, 2006 produziram estolídeos a partir de hidroxiácidos, obtido do óleo de lesquerella e mamona, por rota química, com diferentes graus de saturação e o uso de diversos ácidos graxos como terminadores na reação de capeamento dos estolídeos livres. Seus estudos mostraram que os estolídeos que possuíam melhor atuação a baixas temperaturas (pontos de fluidez e névoa) eram aqueles obtidos pela conjugação da molécula de ácido oléico ou do ácido 2-etil-1-hexanóico. Além disto, de acordo com MOULOUNGUI e PELET, 2001, um éster apresenta boa estabilidade térmica se ocorre a ausência de átomos de hidrogênio no carbono β à sua porção alcoólica. Quando presente, o hidrogênio favorece a decomposição do éster por meio de um mecanismo cíclico que envolve pouca energia levando à formação de um ácido e de um alceno. No caso de ésteres sem hidrogênio β, o mecanismo que ocorre envolve apenas radicais livres, sendo necessária mais energia e elevadas temperaturas.

Desta forma, para ésteres do 2-etil-hexanol, aplica-se raciocínio semelhante. O álcool tem uma ramificação etílica na posição β ao grupamento hidroxila, a qual provoca impedimento estérico em torno da ligação éster, conduzindo a uma maior estabilidade térmica e a uma maior resistência à oxidação. Além disso, uma das justificativas para a afinidade da CRL com o ácido ricinoléico é a relação entre a forma da molécula e o sítio ativo da enzima, que possui um formato em "L", sendo este formato também encontrado na molécula do 2-etil-1-hexanol. Assim, a utilização deste álcool pode favorecer a reação com a enzima CRL o que não tornaria necessária a troca da enzima para a reação de terminação do estolideo.

Sendo assim, as reações de terminação dos estolídeos foram investigadas para os álcoois 2-etil-1-hexanol e etanol. Este último foi utilizado por ser um álcool linear simples, abundante no Brasil, e de custo inferior.

Existem registros na literatura quanto ao uso da lipase imobilizada de *R. miehei* para catalisar a esterificação de mono- e poliestolídeos derivados sinteticamente do ácido oléico, com álcoois graxos ou diálcoois (HAYES; KLEIMAN, 1995). Tal enzima apresentou melhores rendimentos para os álcoois graxos (95%) do que para os diálcoois (60%). Além desta enzima, foi utilizada a própria CRL, enzima já utilizada para a reação anterior de formação dos estolídeos livres e a CALB. Sendo assim, como todas as enzimas utilizadas neste estudo realizam tanto a esterificação, quanto a hidrólise e, como a esterificação gera água como um de seus produtos, foi utilizada a razão molar de 1:1,5 álcool para garantir que haja um pequeno excesso de álcool e que diminua a possibilidade do equilíbrio da reação deslocar para a hidrólise. Os resultados são demonstrados na Figura 33.

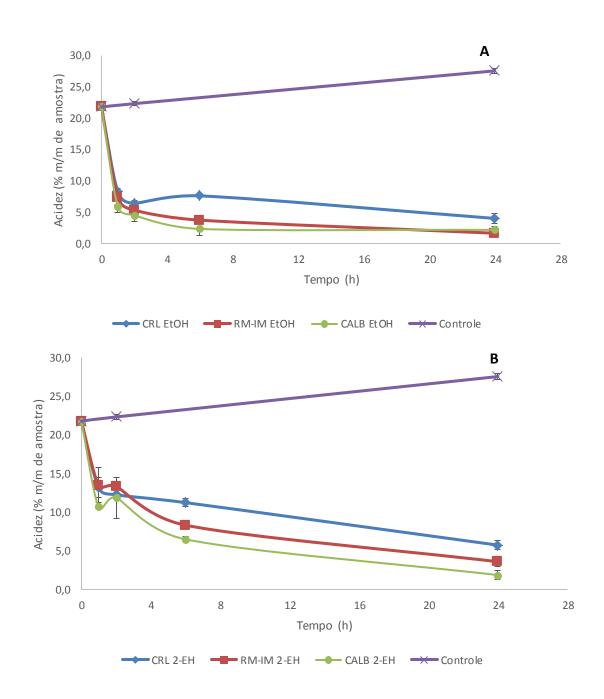


Figura 33 (A) reações de esterificação do terminal carboxílico dos estolídeos de 14 h com a utilização de etanol (EtOH). (B) reações de esterificação do terminal carboxílico dos estolídeos de 14 h com a utilização de 2-etil- 1- hexanol (2-EH). As reações foram conduzidas com a razão molar de 1:1,5 utilizando 10 g de estolídeo e 4 % m/m de enzima, a 40 °C e agitação constante. O controle reacional foi realizado com a CRL e o estolídeo de 14 h sem a presença de álcool.

A Figura 33 mostra a diminuição da acidez total (% m/m amostra) durante a reação de esterificação entre os álcoois etanol e 2-etil-1-hexanol e os terminais carboxílicos remanescentes nos estolídeos. Claramente, em todos os casos houve a esterificação, ao

menos do terminal carboxílico, da maior parte dos estolídeos livres exceto na reação controle (sem álcool) que inclusive aumentou, em taxa ínfima, a acidez, indicando o rearranjo das moléculas de estolídeos por meio do equilíbrio hidrólise e esterificação.

Como se pode observar, foi possível diminuir a acidez em todas as reações com álcoois, utilizando quaisquer uma das 3 enzimas (CRL, CALB e RM-IM). No entanto, é notável a diferença entre a reação com etanol (Figura 33 A) e com o 2-etil-1-hexanol (Figura 33 B). A utilização da lipase de *Candida antartica* comercial (CALB) foi a responsável pelas maiores reduções na acidez total, sendo em 6h de reação, aproximadamente 2,3 % e 6,6% m/m, para os álcoois etanol e 2-etil-1-hexanol, respectivamente. A lipase de *Rhizomucor miehei* comercial (RM-IM) também obteve bons resultados. A acidez total atingiu, em 6 h, a média de 3,7% e 8,3% m/m para o etanol e 2-etil-1-hexanol, respectivamente. A enzima *Candida rugosa* (CRL), não obstante, apresentou resultados satisfatórios com o etanol e 2-etil-1-hexanol atingindo aproximadamente 7,6% e 11,2% m/m, respectivamente. Estes resulatdos podem indicar que a lipase CRL continua catalisando o rearranjo das moléculas de estolídeos simultaneamente a esterificação dos terminais livres dos mesmos estolídeos, como pode-se reparar pela comparação com a reação controle (sem álcool). Entretanto para conhecer as estruturas formadas seria necessário o estudo por RMN dos produtos o que não pode ser realizado neste estudo preliminar.

SYAHIR et al. (2017) relataram que esta etapa de capeamento do estolídeo possui custo elevado devido ao uso de ácidos graxos de maior valor, como o ácido oléico e o ácido 2- etil -1-hexanóico. Neste trabalho, a aquisição de estolídeos acabados por via enzimática foi possível em um total de 20 h de reação, em condições amenas (40 °C) utilizando um álcool de menor custo e abundante no Brasil, o etanol.

7.11 Caracterização dos estolídeos livres e acabados

No item 7.9.2 foi abordado o estudo do alongamento dos estolídeos durante a reação. Sendo assim, três misturas de estolídeos livres, com diferentes tamanhos de cadeia foram selecionados para a caracterização: estolídeos de 6 h de reação, cuja composição é

majoritariamente formada de dímeros; estolídeos de 14 h, cujos oligômeros atingem hexâmeros e heptâmeros; e, estolídeos de 20 h, cuja mistura chega ao grau de polimerização de heptâmeros e octâmeros (metodologia descrita em 7.4). Além disso, foi feita a caracterização dos estolídeos acabados provenientes da esterificação dos estolídeos de 14 h com os álcoois etanol e 2-etil-1-hexanol (metodologia descrita em 7.5). Estes diferentes estolídeos, provenientes de diferentes tempos reacionais, são caracterizados com o objetivo de comparar diferentes tamanhos de cadeia de estolídeos e analisar a sua influência nas características lubrificantes como: ponto de fluidez, viscosidade a 40 e a 100 °C, índice de viscosidade, índice de acidez total, estabilidade oxidativa, além do NE e conversão dos ARL em estolídeos.

A caracterização quanto as características lubrificantes dos diferentes estolídeos estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 Caracterização quanto às características lubrificantes dos diferentes estolídeos livres obtidos em 6, 14 e 20 h de reação e suas comparações com os estolídeos obtidos pela reação do estolídeos de 14 h com etanol e 2-etil-1-hexanol. A reação de formação de estolídeos foi feita utilizando AGLM, CRL (4% m/m) e água (15% m/m), a 40 °C sob agitação mecânica de 200 rpm. O NE foi realizado por RMN descritas em 0, a conversão dos ARL em estolídeos conforme descrito em 7.6.2 e as demais análises de caracterização estão descritas na 4.2.2.

	NE*	CAR*	V 40 °C*	V 100 °C*	IV*	EO* (min)	PF *	IAT *(mg KOH/g de amostra)
								amostraj
6 h	0.7	65,4	103,8	11,70	101	32	-33	116,7
14 h	5.5	97,6	153,7	19,20	142	37	-45	57,6
20 h	6.5	98,1	210,9	27,10	164	43	-48	36,8
Etanol	5,5	98%	98,06	15,50	168	45	-54	6,14
2-etil-1-	5,5	98%	92,01	14,21	159	49	-57	9,71
hexanol								

^{*} NE- número de estolídeo; CAR – porcentagem de conversão de ARL em estolídeos (tópico 7.6), Equação 9; V 40°C – viscosidade medida à 40 °C (mm²/s); V 100°C - viscosidade medida à 100 °C (mm²/s); IV – índice de viscosidade; EO– estabilidade oxidativa (min); PF– ponto de fluidez (°C); IAT – índice de acidez total (mg KOH/g de amostra).

Pelos resultados apresentados na Tabela 13, na comparação entre os estolídeos livres, se observa uma melhora nas características lubrificantes, de uma forma geral, com o aumento do tempo de reação e, portanto, com o aumento do grau de polimerização. Tais características como o IV, o PF e a EO melhoram ainda mais com a esterificação do terminal carboxílico da maioria dos estolídeos, formando um produto com grande concentração de estolídeos acabados. Cada uma das propriedades lubrificantes, descritas na Tabela 13, serão analisadas, nos tópicos a seguir.

7.11.1 Índice de acidez total (IAT)

O IAT é o parâmetro avaliado para medir a estabilidade hidrolítica. Quanto menor o IAT melhor a sua estabilidade química e térmica. A ligação éster presente nos óleos vegetais quimicamente modificados (CMVOs) os torna mais propensos à sofrerem hidrólise, pela exposição a ambientes aquosos. Uma baixa acidez, um alto grau de esterificação e um baixo nível de resíduos de processo aumentam a estabilidade hidrolítica dos CMVOs (RUDNICK, 2006). Para a aplicação como lubrificantes, são desejáveis valores inferiores a 0,5 mg KOH/g, uma vez que valores elevados de acidez contribuem para aumentar efeitos de corrosão (SILVA, 2012; BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a).

O IAT diminui com o tempo, o que é esperado devido à esterificação dos grupamentos carboxila que ainda estão presentes, no meio reacional, devido aos AGLM e aos estolídeos livres. Este índice é facilmente resolvido com a esterificação deste terminal carboxílico livre com álcoois simples, conforme podemos notar na Tabela 13, na qual há a diminuição do IAT do produto de 14 h de 57,6 para 6,14 mg KOH/g de amostra após 6 h de reação com o etanol e 9,71 mg KOH/g de amostra após 24 h de reação com o 2-etil-1-hexanol. Os valores obtidos ainda não correspondem a faixa desejada para a utilização como lubrificantes. Entretanto, esta reação ainda não foi otimizada, sendo este apenas um teste preliminar que prova ser possível reduzir a acidez do produto final com uma etapa simples de esterificação. Além disso, o IAT pode ser reduzido, complementarmente, por meio de destilação molecular para a eliminação dos AGLM que possam estar livres no meio reacional.

7.11.2 Viscosidades a 40 e a 100 °C

A viscosidade é considerada a propriedade mais importante do lubrificante, pois interfere diretamente na formação da película protetora dos metais, evitando o desgaste friccional e, apesar de não se ter valores pré definidos, por razões de mercado, a faixa de 8 a 15 cSt a 100 °C é a que encontra um maior número de aplicações (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013c; SILVA, 2012). As viscosidades a 40 e a 100 °C aumentaram conforme o aumento da cadeia dos estolídeos livres e, portanto, sua

massa molar, o que está de acordo com os trabalhos de GARCÍA-ZAPATEIRO et al., (2013b), ERHAN e PEREZ (2002) e ISBELL e colaboradores (2006).

Nos estolídeos livres, que são a maioria encontrada nas amostras de 6, 14 e 20 h, tanto o terminal carboxílico quanto a hidroxila no carbono 12 da molécula base do estolídeos estão livres, preservando suas ligações hidrogênio entre o oxigênio e o hidrogênio (OH) (Figura 31). No entanto, ao ser esterificado com os álcoois simples, as viscosidades caíram de (viscosidades a 40 e 100 °C, amostra) 153,7 e 19,20, nos estolídeos de 14 h, para: 98,06 e 15,50, no caso do etanol; e 92,01 e 14,21, para o 2-etil-1-hexanol, como pode ser observado na Tabela 13, o que enquadrou as viscosidades de 100 °C dentro da faixa de maiores aplicações de mercado.

Segundo ISBELL et al. (2006), os dois principais fatores que afetam a viscosidade são a ligação de hidrogênio dos grupos hidroxila e o volume estérico das moléculas. No caso dos estolídeos livres, a ligação de hidrogênio intermolecular dos grupamentos hidroxi, sejam do terminal carboxílico ou a própria hidroxila do carbono 12, aumenta o volume estérico da solução pois cria dímeros fracamente associados, trímeros, etc. dos estolídeos livres, aumentando assim a viscosidade do óleo. Os estolídeos monoacabados, portanto, têm viscosidades mais baixas devido a esterificação da porção hidroxila e os estolídeos acabados tem viscosidades ainda menores devido a eliminação das ligações de hidrogênio e consequentemente a redução da viscosidade do óleo. Como esta reação de esterificação dos estolídeos livres ainda não foi otimizada, pode-se esperar que estas viscosidades diminuam ainda mais com a formação de um produto contendo apenas estolídeos acabados.

7.11.3 Índice de viscosidade (IV)

O IV, como já dito, indica a variabilidade do fluido com a mudança de temperatura e é calculado com base na V 40 °C e V 100 °C (ASTM D2270, tópico 4.2.2.4). Quanto maior é o IV, menor será a diminuição da viscosidade com as mudanças de temperatura.

O produto de 6 h tem o menor IV (101), seguido do produto de 14 h (IV=142) e o produto de 20 h (IV=164), mostrando que os IVs também variam de acordo com o NE e portanto com o tamanho da molécula. Embora os maiores IVs sejam mais importantes para

diversas aplicações, sendo os IVs mais favoráveis às aplicações quando se aproximam de 200 (ERHAN et al, 2002), também existem utilizações que exigem a variação do fluido de acordo com a temperatura como óleos para trabalhar com metais (ferramentas de corte e laminação), óleos de processamento de borracha (extensores), óleos isolantes de componentes elétricos (transformadores), fluidos de amortecedores e na formulação de graxas (DO BRASIL et al., 2012; ROCCO et al., 2016; SILVA, 2012). Este fato torna todos os estolídeos obtidos na Tabela 13 interessantes do ponto de vista de aplicação industrial. A esterificação do terminal carboxílico também levou ao aumento do IV do estolídeo livre de 14 h que passou do valor de 142 passou a 168, no caso da reação com etanol, e a 159, no caso da reação com 2-etil-1-hexanol. Estes resultados são interessantes para aplicações nas quais não se requer a variação da viscosidade de acordo com a alteração de temperatura.

7.11.4 Ponto de fluidez (PF)

Os derivados de óleo de mamona têm valores baixos de PF, que é a temperatura mínima na qual o óleo ainda é fluido. Quanto menor o PF, menor a temperatura que o óleo permanecerá fluido. Pontos de fluidez de -20 a -45 °C pertencem a uma faixa interessante uma vez que engloba a maior parte das aplicações lubrificantes. Os valores inferiores a -36 °C apresentam grande destaque uma vez que não existem óleos básicos de origem vegetal sintetizados via catálise química ou enzimática com tais características disponíveis até o momento (ISBELL; EDGCOMB; LOWERY, 2001; SILVA, 2012).

Todos os estolídeos produzidos neste trabalho estão dentro da faixa almejada para as aplicações industriais e, assim como ocorreu para as viscosidades e o IV, conforme aumenta o NE, há a melhoria do PF, isto é, diminui a temperatura na qual o óleo permanece fluido. Nos estolídeos livres, a maior diferença encontrada foi entre 6 h (dímeros) e 14 h (hexâmetros/heptâmeros), na qual o PF diminui de -33 °C para -45 °C, respectivamente. Entre 14 h e 20 h, os estolídeos mudam de hexâmetros/heptameros para heptâmeros/octâmeros, o que resultou na diferença de 3 °C no ponto de fluidez.

Moléculas com duplas ligações e ramificações tendem a ter PFs mais baixos o que é melhor para a caracterização como lubrificantes pois elas diminuem a simetria interna da

molécula, resultando em um decréscimo do PF (CERMAK; ISBELL, 2001; RUDNICK, 2006; SILVA, 2012). No caso dos óleos derivados do óleo de mamona, o PF diminui também devido à ramificação proveniente da presença do grupo hidroxila no carbono 12 do AR. Tais características configuram uma geometria espacial que evita a compactação, tal qual ocorre com os óleos vegetais que são líquidos a temperatura ambiente, mantendo os estolídeos fluidos a baixas temperaturas.

Na literatura (CERMAK; BRANDON; ISBELL, 2006), é possível encontrar relatos sobre a esterificação via catálise química de ácidos graxos de mamona e de lesquerella que foram combinados com diferentes tipos de ácidos graxos: saturados, insaturados e ramificados para produzir estolídeos. Os ésteres de estolídeo de mamona e de lesquerella tiveram as melhores propriedades à baixas temperaturas quando esterificados com ácido oléico (PF = -54 ° C para mamona e -48 ° C para lesquerella) ou ainda quando esterificados com um ácido ramificado, como o ácido 2-etilhexanóico (PF = -51 ° C para mamona e -54 ° C para lesquerella).

No documento US 6018063 (2000) o estolídeo acabado 2-etil-1-hexil estolídeo proveniente da reação entre os ácidos oléico:láurico (2:1) foi o que apresentou o melhor ponto de fluidez (-36 °C). No presente trabalho, os estolídeos acabados apresentaram excelentes pontos de fluidez, atingindo os valores de -54 °C para o etanol e -57 °C para o 2-etil-1-hexanol (Tabela 13). Segundo ISBELL; EDGCOMB e LOWERY, (2001), a porção de álcool do éster desempenha um papel significativo na redução do ponto de fluidez de modo que álcoois de cadeia ramificada, como o 2- etil-1-hexanol, diminuem drasticamente os pontos de fluidez, justificando os valores encontrados.

7.11.5 Estabilidade oxidativa (EO)

Algumas preocupações são levantadas em relação à EO dos fluidos à base de vegetais e, no caso de derivados do óleo de mamona, a baixa EO pode ser explicada pela presença do grupamento hidroxila não esterificado na molécula de ARL e também nos estolídeos livres (Figura 31). Além disto, quanto maior o número de duplas ligações mais susceptível o material será à rápida oxidação, que conduz a um aumento na viscosidade, IAT e corrosão.

Por outro lado, estas duplas ligações são necessárias para manter a fluidez em baixas temperaturas.

A EO dos produtos obtidos às 6, 14 e 20 h, assim como o IV e o PF, aumentou com o tempo de reação e, portanto, com o aumento do grau de polimerização da molécula (Tabela 13). Entretanto, o aumento da EO, neste caso, ocorreu principalmente devido à esterificação da hidroxila do carbono 12, como sugerido por YAO et al. (2010) presentes nos estolídeos livres assim como nos ARL, uma vez que a hidroxila não será usado como potencial agente redutor.

A EO foi melhorada nos estolídeos acabados tornando os lubrificantes mais estáveis pela esterificação com um álcool, como 2-etil-hexanol (49 minutos) ou o etanol (45 minutos), conforme pode ser visto na Tabela 13. Neste caso, além da esterificação interna para a formação do estolídeo, ocorreu também a esterificação do OH presente na carboxila terminal.

Possivelmente, o tamanho da cadeia do álcool, bem como a sua estrutura tridimensional, dificultam o acesso aos hidrogênios alílicos e portanto às ligações duplas dos ácidos ricinoléicos que compõem os estolídeos, aumentando o tempo que a molécula resiste sem ser degradada. Esta hipótese vem do fato de a esterificação com o 2-etil-1-hexanol proporcionar melhores EO (49 minutos) do que o etanol (45 minutos). O Etanol, por ser um álcool mais simples, não proporciona grandes alterações a estrutura tridimensional dos estolídeos, diferentemente do 2-etil-1-hexanol, que por possuir uma ramificação e apresentar maior volume molecular, conduziu a um aumento neste tempo no qual a molécula resiste em ser degradada (melhor EO).

No trabalho de CERMAK; BRANDON; ISBELL, (2006), comparou-se a estabilidade oxidativa dos estolídeos provenientes da esterificação dos ácidos oléico e AGLM com 2- etil-1-hexanol (2-etilhexil oléico-mamona) e dos estolídeos provenientes da esterificação dos ácidos graxos livres de côco e óleo de mamona (2-etil-hexil ester de côco-mamona) utilizando o mesmo teste de oxidação utilizado neste trabalho (RPVOT). Os tempos encontrados para ambos os estolídeos foram de, aproximadamente, 15 min para ambos os estolídeos esterificados. No entanto, ao se adicionar um aditivo antioxidante (3,5% em peso), os tempos de EO aumentaram para 403 min para o estolídeo 2-etilhexil éster de côco-

mamona. ISBELL (2011) adicionou BHT (butil-hidroxi-tolueno): ADA (difenil-amina), em diversas proporções, sempre totaltizando 1% do volume total do estolídeo acabado. As proporções testadas foram (BHT:ADA): 0: 100; 25:75; 50:50; 75:25; e, 100:0, a pior condição foi a de 100:0, que aumentou cerca de 100 vezes a estabilidade oxidativa dos estolídeos acabados. Sendo assim, com uma pequena adição, que não levaria a diminuição de biodegradabilidade do produto final, é possível elevar consideravelmente a EO do biolubrificante obtido, atingindo níveis comerciais.

7.11.6 Comparação com produtos comerciais

Na Tabela 14 são apresentados exemplos de caracterização de alguns óleos básicos / aditivos que são utilizados industrialmente, em diversas proporções, sendo misturados a outros óleos básicos ou aditivos para a composição do produto final almejado para determinada aplicação.

Tabela 14 Propriedades de alguns óleos básicos/aditivos comerciais utilizados em proporções variadas para a composição do lubrificante final de interesse (CERMAK; ISBELL, 2001).

Propriedades	TMP- trioleato	Óleo de canola	PAO	Poliolésteres	Tridecil adipato
V 40 (ASTM D445)	49,00	38,50	5,550	78,30	27,00
IV (ASTM D 2270)	190	207	147	135	-
PF (ASTM D 97)	- 24	-18	-72	-21	-54

Pela comparação dos produtos obtidos neste trabalho com as propriedades dos óleos comerciais podemos afirmar que todos os nossos produtos podem ser utilizados como óleos base para a formulação de biolubrificantes. Maiores IVs e menores PFs são obtidos quanto maior o tempo de reação e aumentam ainda mais com a esterificação nos estolídeos acabados (Tabela 13), indicando que estes podem ser utilizados como aditivos biodegradáveis para produção de lubrificantes acabados. Além disso, todos os produtos obtidos neste trabalho apresentaram os melhores resultados de estabilidade oxidativa e ponto de fluidez de quaisquer óleo básico de origem vegetal já utilizados na indústria. Assim,

os estolídeos e, em particular, os ésteres de estolídeos são adequados para uso como lubrificantes ou aditivos lubrificantes (HAYES, 1996).

A diferença no tempo de reação de produção de estolídeos livres leva a produção de óleos com diferentes propriedades lubrificantes. Sendo assim, dependendo da aplicação e, portanto, das propriedades finais almejadas para o biolubrificante, o óleo básico poderá ser produzido reduzindo ou aumentando-se o tempo reacional. A esterificação dos estolídeos livres com álcoois como o 2-etil-1-hexanol ou mesmo o etanol proporcionaram melhorias nas caracterizações dos produtos obtidos, permitindo a produção de diversos óleos básicos/acabados.

Capítulo 8

8 Estudo da otimização da reação de produção de estolídeos lubrificantes livres

Neste Capítulo, tendo-se em vista o tempo de consumo total do ARL na reação de formação de estolídeos (14 h), o objetivo foi de estudar a otimização desta reação visando diminuir o tempo de consumo total e obter um produto semelhante ao produzido anteriormente ou características lubrificantes mais promissoras. Para isto foi realizado um planejamento experimental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) como ferramenta. Além da metodologia para quantificação do ARL descrita no Capítulo 7 (7.6), foi utilizada a metodologia titulométrica, descrita em 4.2.1, e os produtos foram caracterizados conforme a metodologia descrita em 4.2.2.

8.1 Investigação das condições de produção de estolídeos

8.1.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Os principais parâmetros que afetam a reação de produção de estolídeos foram investigados utilizando como ferramenta o planejamento experimental. Primeiramente, foi realizado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para avalição das condições reacionais da produção de estolídeos. Assim, foram estudadas as variáveis: temperatura (37,5 a 50 °C), concentração de enzima (1 a 4% m/m) e água (12,5 a 21,9% m/m). Na Tabela 15, na sessão dos Resultados, estão as variáveis e os valores utilizados no planejamento. A variável de resposta utilizada foi a conversão do ácido ricinoléico em estolídeos, calculada no tempo de 4 h, a partir do seu consumo do meio reacional segundo a Equação 10. Os resultados foram analisados com o auxílio do software Statistica 7.0 (Statsoft, USA).

8.1.2 Avaliação do efeito da temperatura na reação

Após a avaliação estatística dos dados obtidos a partir das variáveis resposta do DCCR, foram realizadas reações de produção de estolídeos, avaliadas quanto à acidez e a quantidade de ácido ricinoléico, no tempo de 2 h, para garantir que a curva de consumo do ácido ricinoléico estará na taxa inicial de reação (parte linear do gráfico). As temperaturas utilizadas foram 45, 47,5 e 50 °C e, para cada temperatura, foi testada a condição sugerida pelo planejamento: teor de água a 18,6% m/m e teor de enzima a 2,5% m/m, e os menores valores desconsiderando os pontos estrela do DCCR: água à 14,4% m/m e enzima à 1,61% m/m. Totalizando 6 experimentos realizados em duplicatas biológicas e triplicatas analíticas.

8.1.3 Cinética de produção de estolídeos otimizada

As reações consistiam em 12 g de AGLM, 14,4 % m/m de água e 1,61 % m/m de enzima. Após homogeneização 0,19 g de CRL foram adicionados a mistura dando início à reação. A reação foi realizada em quadruplicata e alíquotas de 400 µL foram retiradas de dois reatores, alternados, durante 24 h de reação. As reações foram conduzidas primeiramente a 50 e posteriormente 45 °C, em reatores encamisados, sob agitação magnética constante. Cada alíquota foi centrifugada (10.000 rpm por 10 min) e a quantidade de ácido ricinoléico (% m/m de amostra) foi caracterizado pela análise de CG descrito no tópico 7.6.

8.2 Reuso da enzima

Para realizar o reuso da enzima, o tempo escolhido para retirar a reação foi aquele no qual o ácido ricinoléico atinge quantidades mínimas (< 4g/100g de amostra). As reações consistiam em 12 g de AGLM, 14,4 % m/m de água e 1,61 % m/m de enzima. Após homogeneização 0,19 g de CRL foi adicionada a mistura dando início às reações que foram conduzidas em triplicatas, primeiro a 50 °C e em seguida a 45 °C por 4 h e 5 h, respectivamente. A reação foi então centrifugada (10.000 rpm por 10 min), o sobrenadante

foi recuperado e um novo meio reacional foi adicionado ao pellet contendo a enzima, que foi ressuspendida e submetida a uma nova reação. Todas as reações tiveram seu sobrenadante dosado pelo método titulométrico de detecção dos ácidos livres (tópico 4.2.1) e com base na primeira reação, cuja acidez remanescente foi convertida a 100%, foi calculada a conversão relativa. As reações foram feitas até que a conversão relativa atingisse 50%.

No caso da reação de 45 °C também foi feito o reuso utilizando o etanol para lavagem da enzima. Neste caso, o meio reacional foi misturado com etanol 1:1 v/v, este meio foi filtrado em funil de Büchner com papel de filtro, acoplado à uma bomba peristáltica à vácuo até que este secasse. A enzima então foi raspada do papel de filtro e adicionada à uma nova reação.

8.3 Caracterização dos estolídeos livres após otimização da reação

Para caracterizar os produtos formados quanto às propriedades lubrificantes e comparar com o estolídeo obtido anteriormente em 14 h (7.1.1), foi realizado um aumento de escala para reatores com 210 g de AGLM, 14,4% m/m de água e 1,61% m/m de enzima a 45 °C. A reação foi retirada em 6 h, centrifugada (10.000 rpm, 10 min) e o sobrenadante foi diluído em acetato de etila no qual foi adicionado 10% m/m de sulfato de sódio anidro para secagem do produto. A mistura foi deixada agitando por 30 min e depois filtrada em papel de filtro à vácuo para posteriormente ser recuperada em rotaevaporador (PolyScience®). O produto obtido foi estocado em geladeira a 4 °C até ser caracterizado.

8.4 Resultados

8.5 Investigação dos parâmetros da reação de produção de estolídeos

8.5.1 Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

No Capítulo anterior (7), vimos que foi possível obter estolídeos de maiores massas molares e melhores características lubrificantes, com o aumento do tempo reacional, utilizando-se 4% m/m de enzima e 15% m/m de água. Os estolídeos de maiores tamanhos moleculares se tornam os mais interessantes do ponto de vista industrial, uma vez que se unem três fatores primordiais e difíceis de serem obtidos de formas naturais; são eles: alta viscosidade e índice de viscosidade e baixos pontos de fluidez. Assim, visando diminuir o tempo de obtenção destes estolídeos (aumentar a produtividade) e minimizar custos (diminuição da concentração de enzima), foi realizado um planejamento experimental do tipo DCCR cujas variáveis independentes estudadas e as faixas utilizadas estão na Tabela 15. Para os cálculos destas variáveis, foram estabelecidos dois pontos para cada variável: água +1 = 20% e -1,68= 12,5% m/m; concentração da enzima +1,68 = 4% m/m e -1,68= 1%; e, temperatura + 1,68= 50 °C e -1 = 40 °C. A conversão do ácido ricinoléico em estolídeos (CAR) foi avaliada em 4 h (conforme descrito em 8.1.1).

Tabela 15 Valores reais e codificados das variáveis estudadas no DCCR.

Variáveis			Níveis		
variaveis _	-1,68	-1	0	+1	+1,68
Temperatura	37,5	40,0	43,7	47,5	50,0
(°C)	37,3	40,0	43,7	47,3	30,0
Concentração					
de enzima (%	1	1,61	2,5	3,4	4
m/m de AGLM)					
Água (% m/m	12,5	14,4	17,2	20	21,9
de AGLM)	12,3	±-r, -1	17,2	20	21,3

A CAR calculada para 4 h bem como a matriz utilizada para os ensaios do planejamento estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 Matriz de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com os valores codificados das variáveis e os valores da conversão do ácido ricinoléico (CAR), calculada em 4 h, para cada ensaio realizado.

Ensaio	Temperatura (°C)	Água (% m/m)	Enzima (% m/m)	CAR (%)
1	-1	-1	-1	28,5
2	1	-1	-1	86,8
3	-1	1	-1	21,1
4	1	1	-1	85,5
5	-1	-1	1	29,9
6	1	-1	1	90,1
7	-1	1	1	26,4
8	1	1	1	85,3
9	-1,68	0	0	61,7
10	1,68	0	0	92,7
11	0	-1,68	0	19,6
12	0	1,68	0	30,5
13	0	0	-1,68	27,6
14	0	0	1,68	35,7
15	0	0	0	94
16	0	0	0	91,7
17	0	0	0	93,2

Podemos observar na Tabela 16 que os maiores valores obtidos de CAR foram aqueles nos quais a temperatura era, em variáveis codificadas: +1 (47,5 °C) – ensaios 2, 4, 6 e 8 – e no ponto estrela +1,68 (50 °C) – ensaio 10 – independente da concentração de enzima ou água utilizadas. Nos pontos centrais obtivemos também valores elevados de CAR e nestes, todos os parâmetros permanecem na variável codificada 0 – ensaios 15, 16 e 17.

Por meio da análise estatística dos dados, realizada com o auxílio do software Statistica 7.0®, foram estimados os efeitos das variáveis estudadas, bem como a interação entre elas. Os efeitos padronizados das variáveis (valores de t) e a probabilidade de significância do teste (valor de p) foram utilizados para avaliar a significância dos efeitos das variáveis temperatura, concentração de água e de enzima sobre a conversão do ácido ricinoléico livre em estolídeos. Para a análise dos resultados (Tabela 16), foram consideradas significativas as variáveis com p-valores menores que 5% (p < 0,05), mesmo com a variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e microrganismos. Sendo assim, a variável em questão deve apresentar valor de p menor que 0,05 (95 % de confiança).

Tabela 17 Coeficientes de regressão para a resposta CAR do DCCR. Os termos lineares estão indicados pela letra L e os termos quadráticos pela letra Q. Em negrito estão destacados os efeitos estatisticamente significativos.

	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t(7)	р	Lim. de confiança -95%	Lim. de confiança 95%
Média	92,0	10,4	8,81613	0,000049	67,3	116,6
(1) T (°C)(L)	21,5	4,9	4,39435	0,003179	9,9	33,1
T (°C)(Q)	-2,2	5,4	-0,41028	0,693870	-15,0	10,6
(2)A(% m/m)(L)	0,1	4,9	0,01962	0,984895	-11,5	11,7
A (% m/m)(Q)	-20,7	5,4	-3,83222	0,006439	-33,5	-7,9
(3)E(% m/m)(L)	1,7	4,9	0,35002	0,736621	-9,9	13,3
E (% m/m)(Q)	-18,4	5,4	-3,39915	0,011456	-31,1	-5,6
1L x 2L	0,6	6,4	0,09374	0,927946	-14,5	15,7
1L x 3L	-0,4	6,4	-0,07030	0,945920	-15,6	14,7
2L x 3L	0,1	6,4	0,00781	0,993986	-15,1	15,2

A = água; E = enzima; T = temperatura. Coeficiente de determinação: R²=0,85

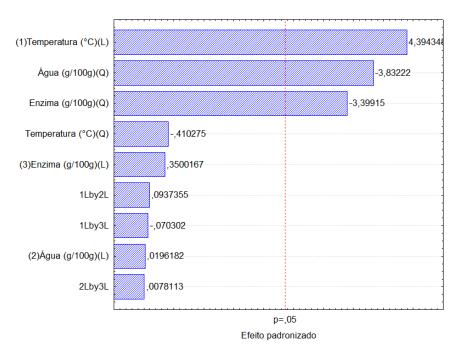


Figura 34 Efeitos padronizados da conversão de ácido ricinoléico em estolídeos.

Adotando-se um nível de 5% de significância (valor de p < 0,05), pode-se observar que apenas a temperatura (termos lineares indicados pela letra L) e os termos quadráticos (indicados pela letra Q) referentes à água e à enzima, tiveram efeitos estatisticamente significativos neste planejamento sendo seus valores de p < 0,05 (Tabela 17). Na Figura 34 pode-se analisar o gráfico de Pareto para os efeitos analisados nos quais os efeitos padronizados (t) são demonstrados. No caso da temperatura, este efeito foi positivo indicando que maiores valores conduziriam a maiores conversões. Já os termos quadráticos da água e da enzima obtiveram efeitos negativos, o que indica apenas que a curvatura da superfície de contorno será para baixo. Ignorando os efeitos não significativos foi possível gerar uma nova tabela (Tabela 18) com os coeficientes de regressão, a qual foi utilizada para construção de um modelo matemático para a resposta analisada (CAR) em função das variáveis independentes codificadas (Equação 11). Assim foram incluídos no modelo apenas os fatores estatisticamente significativos (valor de p < 0,05).

Tabela 18 Coeficientes de regressão com efeitos estatisticamente não significativos ignorados

	Coef. de regressão	Erro padrão	t(7)	р	Lim. de confiança -95%	Lim. de confiança 95%
Média	89,1	5,9	15,1754	0,000000	76,4454	101,8238
(1)Temp. (°C)(L)	21,5	3,7	5,8621	0,000056	13,6005	29,4752
Água (g/100g)(Q)	-20,0	3,9	-5,1807	0,000177	-28,3974	-11,6834
Enzima (g/100g)(Q)	-17,7	3,9	-4,5762	0,000520	-26,0590	-9,3450

$$%CAR = 89,1 + 21,5T - 20A^2 - 17,7E^2$$

Equação 11

Onde:

T= temperatura

A = água

E = enzima

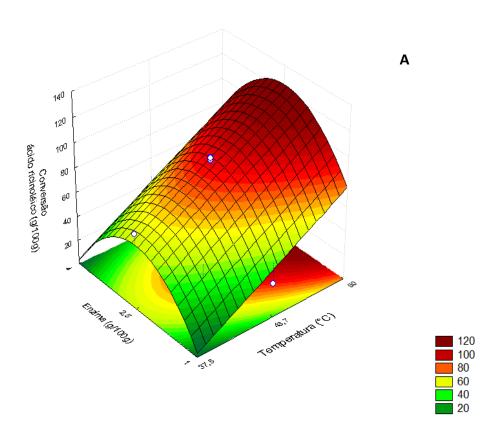
O teste de análise de variância (ANOVA) permitiu a avaliação do ajuste dos modelos gerados (Tabela 19).

Tabela 19 Teste de análise de variância (ANOVA) do DCCR para a conversão máxima do acido ricinoléico em estolídeos.

Fonto do variação	Soma dos	Graus de	Quadrado	F	F
Fonte de variação	quadrados	liberdade	médio	calculado	tabelado
Regressão	13515,7	3	4505,2	24,5	3,41
Resíduo	2394,4	13	184,2		
Erro puro	2,7	2	1,4		
TOTAL	15910,2	16			

Coeficiente de determinação: $R^2=0.85 F_{0.05;3;13}=3.41$.

O coeficiente de determinação (R²) de 0,85 é considerado bom para esse tipo de processo, entretanto, apenas este parâmetro não é o suficiente para avaliar se o modelo é válido, pois são realizados menos de 30 experimentos. Outro parâmetro importante na validação do modelo é o teste F da regressão em relação aos resíduos cujo valor deverá ser maior que o F tabelado. Neste trabalho o F calculado é cerca de 7 vezes maior que o F tabelado. Sendo assim, os dados obtidos pela ANOVA indicam que há um bom ajuste do modelo gerado logo temos uma regressão. Com base neste modelo gerado para a variável resposta CAR (Equação 11), foram construídas as superfícies de respostas em função da temperatura, da concentração de água e da concentração de enzima.



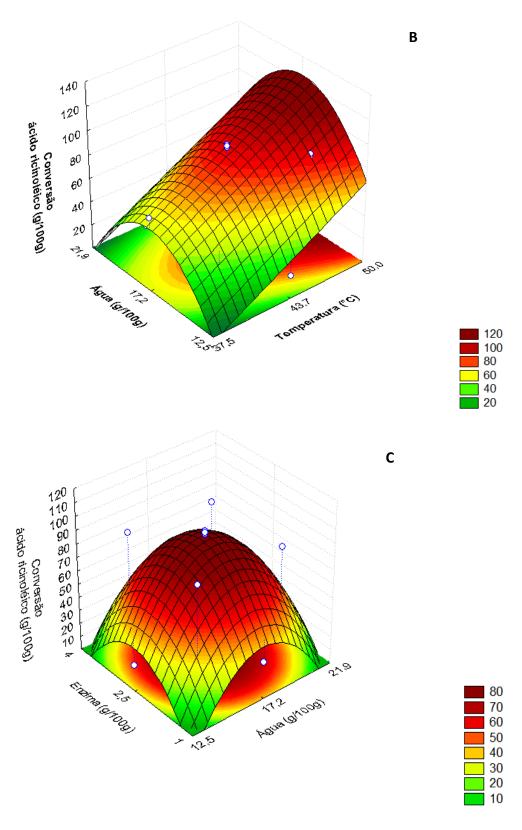


Figura 35 Superfície de resposta para a CAR. (A) temperatura e enzima variando em função da água no ponto central; (B) temperatura e água variando em função da enzima no ponto central; (C) água e enzima em função da temperatura constante no ponto central.

A observação das superfícies de resposta reafirma que apenas a temperatura parece ter tido efeito positivo sobre a conversão do ácido ricinoléico em estolídeos. Pela avaliação do DCCR, temperaturas acima de 45 até 50 °C (limite superior cuja variável codificada foi de +1,68) levaram às maiores conversões dos ácidos graxos em estolídeos, independente da quantidade de enzima e de água utilizada dentro da faixa estudada. No entanto, se mantivermos a temperatura no ponto central (43,7 °C) para que as conversões sejam altas, a enzima e a concentração de água também deverão se manter nos pontos centrais (17,2 e 2,5 % m/m para água e enzima respectivamente).

Quando foi analisada a influência da água na reação de produção de estolídeos Tabela 11, se observa que a partir da concentração de 1 % m/m de água, todas as reações parecem ter sua taxa inicial de reação aumentada. Além disto, foi observado também que a água evapora espontaneamente do sistema permanecendo uma porção vestigial de 2000 – 3400 ppm em todas as reações após 24 h, inclusive no controle, o que indica que esta água vestigial é proveniente da reação de esterificação e não do aporte inicial. O natural é que o aumento de temperatura esteja influenciando na taxa de evaporação da água do sistema e possivelmente isso auxilia a atingir maiores conversões, embora a interação entre água e temperatura não tenha se apresentado significativa. Além disto, provavelmente, a água está influenciando na dispersão da enzima pelo meio reacional, auxiliando na formação da interface orgânico-aquosa necessária para o início da reação. A quantidade de enzima utilizada anteriormente, de 4 % m/m, parece ser excessiva uma vez que a utilização de 1,61 % m/m, na temperatura de 47,5 °C propiciou conversões de 85,5 e 86,8 para 17,2 e 14,4 % m/m de água em apenas 4 h de reação. Através do modelo gerado, foi possível chegar a valores críticos sugeridos pelo DCCR (Tabela 20).

Tabela 20 Valores críticos sugeridos pelo DCCR para se obter as maiores conversões do ácido ricinoléico em estolídeos

	Mínimo observado	Valores críticos	Máximo observado
Temperatura (°C)	-1,68000	4,87	1,68
Água (g/100g)	-1,68000	0,07	1,68
Enzima (g/100g)	-1,68000	-0,01	1,68

Fazendo a conversão dos valores codificados para valores reais, encontram-se 18,6 % m/m de água e 2,5 % m/m de enzima, no entanto, para a temperatura, o valor encontrado foi elevado demais para um sistema biológico e se encontra fora da faixa o que mostra que este valor não tem relevência estatística. O planejamento experimental é apenas uma ferramenta para auxiliar o entendimento e indicar o caminho para a solução almejada. Pelas superfícies de resposta nas quais a temperatura não foi fixada Figura 35 A e B não há um limite de temperatura, no entanto a conversão não poderá atingir valores superiores a 100% conforme o modelo indica. No caso de sistemas biológicos, o fator temperatura e tempo sempre devem ser cuidadosamente aplicados uma vez que se trata de micro-organismos ou substâncias provenientes de micro-organismos que têm, portanto, características específicas.

8.5.2 Avaliação das melhores condições reacionais

O perfil de temperatuta da enzima CRL utilizada neste trabalho situa-se na faixa de 40 – 55 °C (BIOCATALYSTS, 2011). Assim, considerando os bons resultados de conversão obtidos pela matriz foram realizados testes experimentais com os menores valores de enzima e de água correspondentes as variáveis -1 (14,4 % m/m de água e 1,61 % m/m de enzima) e os valores propostos pelo planejamento 18,6 % m/m de água e 2,5 % m/m de enzima. Estas condições foram avaliadas nas temperaturas de 45, 47,5 e 50 °C. Os resultados para a CAR foram realizados para o tempo de 2 h, uma vez que não foi possível detectar diferenças significativas entre os valores anteriormente encontrados em 4 h de reação no DCCR, para os ensaios com maiores conversões, além de todos serem próximos a 90%, o que

indica o final da reação. A Tabela 21 apresenta os experimentos e os resultados destes testes.

Tabela 21 Otimização das condições pré-selecionadas pelo DCCR sendo a CAR calculada com base no ARL em 2 h de reação.

Formariananta	Água	gua Enzima Temperatura		ARL (%	Resultado
Experimento	(% m/m)	(% m/m)	(°C)	m/m)	(CAR)
А	18,6	2,5	50	18	76,9 ± 5,9
В	14,4	1,61	30	19	74,4 ± 1,5
С	18,6	2,5	47,5	27	64,1 ± 1,4
D	14,4	1,61	47,5	21	71,7 ± 1
Е	18,6	2,5	45	33	56,7 ± 0,8
F	14,4	1,61	.5	26	65,3 ± 7,3

Os resultados provenientes da Tabela 21 nos permitiram concluir que a temperatura de 50 °C foi a responsável pelos melhores resultados em 2 h de reação (Tabela 21, experimentos A e B), o que corrobora com a resposta do planejamento experimental, a qual indicou que, quanto maior a temperatura, maior a conversão em estolídeos. Os demais experimentos realizados apresentaram como melhores opções aquelas com a menor concentração de enzima e de água (1,61 e 14,4 % m/m, respectivamente), indicando que maiores quantidades de água podem diminuir a taxa inicial de reação, em tempos menores, fator que possivelmente não será observado em tempos maiores. Tal fato não ocorre a 50 °C pois a alta temperatura possivelmente auxilia a evaporação do excedente de água do sistema permitindo que ambas as conversões atinjam valores semelhantes. Quanto maior a temperatura, menor a diferença entre as condições utilizadas. Como não houve variação significativa, a 50 °C, entre os dois testes realizados (A e B), optamos pela condição com menor concentração de enzima ou seja a condição B. No entanto, esta condição é bem próxima do limite ótimo de temperatura da enzima o que pode significar perda de atividade inviabilizando sua reutilização.

A cinética de consumo de ARL ao longo do tempo é mostrada na Figura 36.

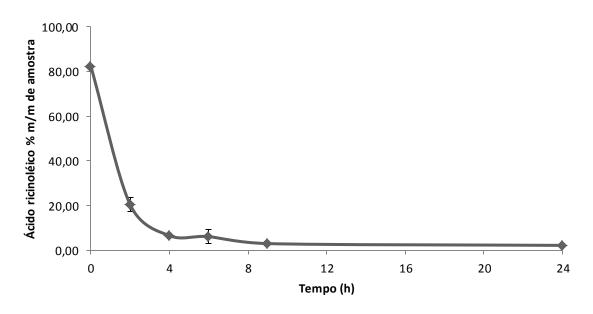


Figura 36 Cinética de consumo de ácido ricinoléico e formação de estolídeos. A cinética foi realizada conforme descrito na 8.1.3. Utilizando 1,61 % m/m de CRL, 14,4 % m/m de água e AGLM. As reações foram conduzidas a 50 °C, sob agitação constante.

Em apenas 4 h de reação, a concentração de ácido ricinoléico já atinge concentrações mínimas no meio reacional - 6,42 % m/m de amostra — este valor persiste até 6 h com pouca variação (atingindo 6 % m/m de amostra), sendo assim foi escolhido o ponto de 4 h para os reusos da enzima a 50 °C. Os resultados podem ser vistos na Figura 37.

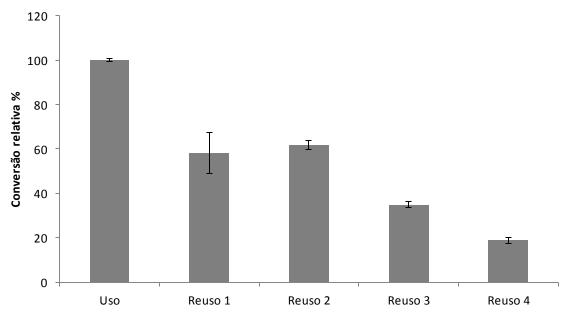


Figura 37 Reuso da CRL, a 50 °C, na reação contendo 1,61 % m/m de enzima, 14,4 % m/m de água e AGLM. A reação foi conduzida por 4 h, sob agitação magnética constante.

O reuso da enzima na temperatura de 50 °C não foi satisfatório, atingindo 35 % da conversão obtida no terceiro reuso. Este resultado já era esperado, uma vez que a temperatura recomendada de uso da enzima situa-se na faixa de 40 – 45 °C embora sua faixa de atuação seja maior (40 - 55 °C)(BIOCATALYSTS, 2011). Possivelmente, para podermos reutilizar a enzima nesta temperatura seria necessário um estudo da imobilização da mesma, o que possivelmente levaria a uma aumento da sua termoestabilidade (AGUIEIRAS et al., 2011; PALOMO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2013; VOLPATO, 2009). Além disto, o estudo da imobilização deverá ser acompanhado dos estudos das condições reacionais, que possivelmente irão alterar, principalmente no que diz respeito a concentração de água utilizada no meio reacional (BÓDALO et al., 2009; YOSHIDA et al., 1997). Desta forma, procurando uma temperatura que possibilitasse aumentar os reusos da enzima livre, utilizada nesse trabalho, escolhemos a condição F (45 °C, 1,61 e 14,4 % m/m de enzima e água respectivamente) para a realização da cinética e posteriormente seu reuso.

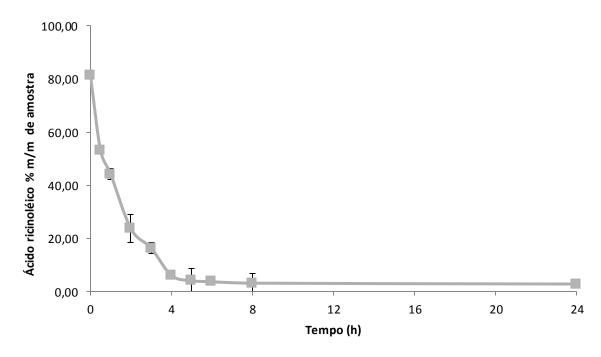


Figura 38 Cinética de consumo de ácido ricinoléico e formação de esto lídeos. A cinética reacional foi realizada utilizando 1,61 % m/m de CRL, 14,4 % m/m de água e AGLM. As reações foram conduzidas à 45 °C, sob agitação magnética constante.

A cinética realizada na temperatura de 45 °C levou o mesmo tempo reacional, de 4 h, para atingir quantidades residuais de ácido ricinoléico livre no meio reacional (6 % m/m de

amostra) e em 5 h de reação, atingiu o mesmo valor que o obtido em 14 h utilizando 40 °C e 2,5 vezes mais enzima para a mesma quantidade de água (<4 % m/m de amostra).

Ao se analisar a concentração de ARL na Tabela 21, percebe-se que a variação, entre as diferentes condições testadas, não é demasiada e esta diferença, entre 50 e 45 °C, possivelmente se deve ao excesso de água ainda não evaporado no sistema a 45 °C. No entanto, após as 2 h de reação, a concentração de água no meio reacional, possivelmente, se igualou à faixa de 2000 – 3400 ppm nas duas reações, conforme visto na Tabela 11 do Capítulo 6, em 24 h, sendo esta a condição que possivelmente permitiu que as reações atingissem o mesmo patamar final após tempo reacional semelhante.

O tempo de 5 h de reação foi utilizado na etapa seguinte do reuso da enzima. Desta vez, além de apenas centrifugar, foi testada a diluição do meio reacional em etanol 1:1 (v/v), e posterior filtração em funil de Büchner a vácuo conforme tópico 8.2, para melhor lavagem do meio reacional que poderia estar impedindo o funcionamento adequado da enzima. Os resultados podem ser observados na Figura 39.

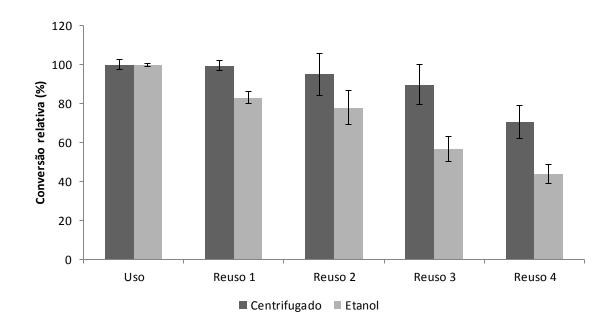


Figura 39 Reuso da CRL na reação, a 45 °C, contendo 1,61 % m/m de enzima, 14,4 % m/m de água e AGLM. A reação foi conduzida por 5 h conforme descrito em 8.3.

A lavagem com o etanol, permitiu o reutilizar a enzima por 4 vezes até que fosse atingido metade da conversão inicial. No caso da utilização de uma etapa de centrifugação após o quarto reuso o meio reacional ainda apresentou 60 % de conversão, indicando que o excesso de etanol na lavagem pode estar inativando a enzima. AGUIEIRAS et al. (2011) utilizou a enzima novozymes 435 a 6% m/m numa reação de 48 h à 80 °C para formação de monoestolídeos de biodiesel metílico de mamona e ácido oléico. Apesar das condições diferenciadas, a enzima mesmo imobilizada possibilitou o reuso por 4 vezes, sendo que no ultimo reuso a reação atingiu exatamente metade da conversão inicial.

Desta forma, utilizando-se enzima livre, que diminui os gastos e tempo com o processo e suportes para a imobilização das mesmas, foi possivel realizar ao menos 4 reutilizações lavando-a com etanol e possivelmente mais reusos com a reação centrifugada. A facilidade do reuso e a quantidade de reusos da enzima livre aumenta a possibilidade de implantação deste processo.

Este reuso foi avaliado no tempo em que a concentração de ARL atingia <4 g/100g de amostra e que correspondia, na reação não otimizada, a polimerização de hexâmeros/ heptâmeros. Desta forma, ainda seria possível utilizar esta enzima para a produção de estolídeos com tamanhos menores de cadeia polimérica. Sendo assim, a enzima reutilizada ainda poderia ser guardada e utilizada para a produção de estolídeos, com menores números de estolídeo e diferentes características, que poderiam, ainda assim, ser aplicados, conforme visto no Capítulo 7, o que aumentaria mais a viabilidade economica do processo.

8.5.3 Avaliação das características lubrificantes

Apesar de a reação otimizada ter apresentado um tempo menor para o consumo do ácido ricinoléico (5 h ao invés de 14 h) nada se sabe sobre as características lubrificantes do produto formado. Para que possamos substituir uma reação pela outra, é necessário que os produtos sejam pelo menos semelhantes quanto a sua caracterização.

Sendo assim, foi realizada a caracterização dos estolídeos produzidos em 5 h pela reação otimizada e este foi comparado com o produto apresentado na Tabela 13 de 14 h que será representado novamente nesta tabela.

Tabela 22 Caracterização quanto às características lubrificantes dos estolídeos obtidos na reação não otimizada, realizada a 40 °C, 4 % m/m de CRL e 15 % m/m de água e sua comparação com os estolídeos obtidos pela reação otimizada a 45 °C, 1,61% m/m de CRL e 14,4 % m/m de água. As análises de caracterização estão descritas na sessão 4.2.2.

	V 40 °0*	V 400 90*	V 400 90* N 1*		EO*	PF*	IAT *
	V 40 °C*	V 100 °C*	IV*	(min)	(°C)	(mg KOH/g de amostra)	
Reação não otimizada	153,7	19,20	142	37	-45	57,6	
Reação otimizada	275,5	29,11	142	48	-42	51,58	

^{*} V 40°C – viscosidade medida à 40 °C (mm²/s); V 100°C - viscosidade medida à 100 °C (mm²/s); IV – índice de viscosidade; EO– estabilidade oxidativa (min); PF– ponto de fluidez (°C); IAT – índice de acidez total (mg KOH/g de amostra).

Conforme observado na Tabela 22, o produto da reação otimizada teve resultados bem semelhantes àquele obtido anteriormente em 14 h na reação não otimizada. Apesar de terem o mesmo IV, a viscosidade do produto otimizado foi maior, bem como a estabilidade oxidativa e seu ponto de fluidez. Tal fato indica que possivelmente a dinâmica de formação do produto é diferente daquele da cinética da reação não otimizada. Desta forma, o produto talvez tenha um número de estolídeos e a distribuição do perfil de estolídeos diferentes do que aquele formado em 14 h na reação não otimizada, o que justificaria a diferença nos valores obtidos. De qualquer forma para fins comerciais, este produto, com a ressalva do ponto de fluidez, foi ainda melhor do que o anterior no quesito estabilidade oxidativa. A esterificação deste produto, obtido pela reação otimizada, para a formação de estolídeos acabados, pode fornecer um biolubrificante ainda mais promissor, no qual, possivelmente o IV será maior e suas viscosidades entrarão na faixa mais utilizada pela indústria, - 8 a 15 cSt a

100 °C, que encontra um maior número de aplicações (BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, 2013a; GARCÍA-ZAPATEIRO et al., 2013c; SILVA, 2012).

9 CONCLUSÕES

- Neste trabalho, foi desenvolvida uma nova forma de obtenção dos ácidos graxos livres de mamona (AGLM), de baixo custo, que garante um produto final de qualidade, em pouco tempo e sem degradação de suas propriedades naturais, uma vez que é realizada em temperaturas amenas e com as próprias sementes de mamoneira.
- O novo processo de hidroesterificação enzimática permite obter, de forma verde e muito eficiente, novos produtos com propriedades que superam as de outros biolubrificantes relatados na literatura. O ácido ricinoléico foi, claramente, melhor nucleófilo para a CRL do que os poliálcoois empregados, e todas as reações sempre tem os estolídeos como o principal produto independente da presença dos poliálcoois ou não, variando o tamanho da sua cadeia polimérica de dímeros até heptâmeros, dependendo do tempo de reação. Os estolídeos puros, sem a presença de poliálcoois, apresentaram características lubrificantes promissoras para uso industrial (melhores ainda do que os produtos obtidos das reações com poliálcoois).
- Os estolídeos obtidos pela reação dos AGLM obtidos por hidrólise enzimática possuem melhores propriedades do que o produto derivado de AGLM comercial possivelmente obtido por tratamento térmico, confirmando que a nova rota não é apenas mais sustentável, mas também mais eficiente.
- ✓ A taxa de redução da acidez (% AGLM consumido.h⁻¹) da reação de produção de estolídeos foi aumentada com o uso de água.
- ✓ O estudo da síntese do estolídeo em 24 h pela cinética de consumo dos ARLs e acidez total, GPC e NE mostrou que o produto é composto por um perfil de vários tamanhos de estolídeos e os estolídeos maiores são provavelmente formados pela conjugação dos menores.

- As propriedades lubrificantes também foram estudadas para estolídeos de 6 h (principalmente composto por dímeros), 14 h (hexâmeros e heptâmeros) e 20 h (heptâmeros e octâmeros). Quanto maior o NE, melhor as propriedades lubrificantes, possibilitando até mesmo o uso como aditivo para óleos básicos, devido às suas características extremas, o que reforça o potencial dos estolídeos como biolubrificantes. Assim, este trabalho descreve pela primeira vez na literatura uma maneira cinética de controlar o tamanho dos estolídeos e sua relação entre o NE e as propriedades dessas moléculas durante a reação.
- ✓ Apesar do IAT ser alto, para se produzir um biolubrificante, foi demonstrado que este índice pode ser resolvido por uma esterificação final com etanol ou 2-etil-1-hexanol.
- ✓ A otimização desta reação por planejamento experiental do tipo delineamento composto central rotacional (DCCR) permitiu a obtenção de um produto semelhante com uma reação igualmente simples e em menor tempo reacional com menores concentrações de enzima o que diminui os custos da reação.
- ✓ Todos os produtos testados neste trabalho podem ser utilizados para produzir óleo básico para vários usos distintos e /ou produção de aditivos que se assemelham aos aditivos sintéticos ou mesmo minerais utilizados comercialmente.

10 PERSPECTIVAS

Baseando-se nos resultados obtidos neste trabalho, é possível pensar em algumas perspectivas:

- Fazer o estudo da produção de estolídeos livres variando a taxa de agitação da reação.
- ❖ Fazer o estudo da produção dos estolídeos livres por FTIR (Fourier transform infrared spectroscopy) e avaliar a formação do produto.
- Otimizar a reação de produção de estolídeos acabados com os álcoois, principalmente o
 2-etil-hexanol, que proporcionou as melhores características.
- ❖ Fazer o estudo da produção de estolídeos acabados por meio da reação otimizada utilizando álcoois maiores simples e secundários variando seus tamanhos de cadeia como o octanol, o dodecanol, o isobutanol e isoctanol. Comparar suas caracterizações e ver como isso influencia nas propriedades lubrificantes dos produtos obtidos. Além disto, observar por RMN a composição das moléculas formadas para verificar a concentração de estolídeos acabados e monoacabados.
- Fazer o estudo da produção de estolídeos acabados utilizando o biodiesel metílico de mamona como agente terminador.

11 REFERÊNCIAS

ABDI, A. B. DE D. IIDUSTRIAL; MDIC, M. DA I. C. E. E S. **Sistema de acompanhamento do INOVAR-AUTO**.

ABNT, A. BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 10004:2004 Resíduos sólidos - Classificação**, 2004.

AGEITEC, A. E. DE I. T. - Exigências Nutricionais da Planta Agência Embrapa de Informação Tecnológica - Exigências Nutricionais da Planta. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/mamona/>. Acesso em: 22 mar. 2018.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Biodiesel production from Acrocomia aculeata acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: Use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. **Fuel**, v. 135, p. 315–321, 2014.

AGUIEIRAS, É. C. G. et al. Simultaneous Enzymatic Transesterification and Esterification of an Acid Oil Fermented Solid as Biocatalyst. **Journal of american oil chemistry society**, v. 94, n. 4, p. 551–558, 2017.

AKERMAN, C. O. et al. Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 72, p. 263–269, 2011.

ÅKERMAN, C. O. et al. Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimisation of trimethylolpropane oleate production. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 2225–2231, 2011.

AKOH, C. C. Oxidative stability of fat substitutes and vegetable oils by the oxidative stability index method. **Journal of american oil chemistry society**, v. 71, p. 211–216, 1994.

ALBERGHINA, L.; LOTTI, M. The evolution of a non universal codon as detected in Candida rugosa lipase. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 3, p. 37–41, 1997.

ALMEIDA, R. V. Clonagem, expressão, caracterização e modelagem estrutural de uma esterase termoestável de Pyrococcus furiosus. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

AMDEBRHAN, B. T. et al. Production of Biolubricant from Castor (Ricinus) Oil. **International Journal of Engineering Innovation & Research**, v. 4, n. 5, p. 2277–5668, 2015.

ARANDA, J. et al. The Catalytic Mechanism of Carboxylesterases: A Computational Study. **Biochemistry**, v. 53, n. 36, p. 5820–5829, 2014.

AVELAR, M. H. M. et al. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 452–458, 2013.

AZEVEDO, D. M. P.; LIMA, E. F. O agronegocio da mamona no Brasil. 21. ed. [s.l: s.n.].

AZIZ, N. A. M. et al. Application of response surface methodology (RSM) for optimizing the palm-based pentaerythritol ester synthesis. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 305–312, 2014.

AZIZ, N. A. M. et al. Temperature effect on tribological properties of polyol ester-based environmentally adapted lubricant. **Tribology International**, v. 93, p. 43–49, 2016.

BAIN & COMPANY; GAS ENERGY. Estudo do potencial de diversificação da indústria química brasileira. 1. ed. São Paulo, Brazil: [s.n.].

BAIN & COMPANY; GAS ENERGY. Potencial de diversificação da industria química Brasileira. Relatório 3 – Óleos lubrificantes, 2014b.

BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: Sources, applications and properties - A review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15–29, 2010.

BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, S. Lubricants: properties and characteristics. In: **Biolubricants Science and technology**. 1° edição ed. USA: Woodhead Publishing Limited, 2013a. p. 24–73.

BART, J.C.J., GUCCIARDI, E., CAVALLARO, S. Renewable feedstocks for lubricant production. In: **Biolubricants Science and technology**. 1° edição ed. [s.l: s.n.]. p. 121–226.

BARTZ, W. J. Lubricants and the environment. **Tribology International**, v. 31, n. 1–3, p. 35–47, 1998.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. Fatty Acids Are Key Constituents of Lipids. In: FREEMAN, W. H. (Ed.). . **Biochemistry**. 5th. ed. New york: [s.n.].

BIOCATALYSTS. Datasheet - LipomodTM 34MDP - L034MDP. v. Revision 5, p. 1, 2011.

BISEN, P. S.; SANODIYA, B. S. Biodiesel production with special emphasis on lipase-catalyzed transesterification. p. 1019–1030, 2010.

BISWAS, A. et al. Microwave irradiation effects on the structure, viscosity, thermal properties and lubricity of soybean oil. **Industrial Crops & Products**, v. 25, p. 1–7, 2007.

BÓDALO-SANTOYO, A. et al. Enzymatic biosynthesis of ricinoleic acid estolides. **Biochemical Engineering Journal**, v. 26, n. 2–3, p. 155–158, 2005.

BÓDALO, A. et al. Production of ricinoleic acid estolide with free and immobilized lipase from Candida rugosa. **Biochemical Engineering Journal**, v. 39, n. 3, p. 450–456, 2008.

BÓDALO, A. et al. Influence of the operating conditions on lipase-catalysed synthesis of ricinoleic acid estolides in solvent-free systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 44, n. 2–3, p. 214–219, 2009.

BRAHIM, K. et al. Lesquerella fendleri seed oil content and composition: harvest date and plant population effects. **Industrial Crops and Products**, v. 5, n. 3, p. 245–252, set. 1996.

BRUTTEL, P.; SCHLINK, R. Water Determination by Karl Fischer Titration. **Monograph Metrohm Ltd.**, v. Herisan, S, 2006.

CAI, Q. et al. Enhanced activity and stability of industrial lipases immobilized onto spherelike bacterial cellulose. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 109, p. 1174–1181, 2018.

CANCHUMANI, G. A. L. Óleos lubrificantes usados: um estudo de caso de avaliação de ciclo de vida do sistema de rerrefino no Brasil. [s.l: s.n.].

CARLSON, K. D.; CHAUDHRY, A.; BAGBY, M. O. Analysis of oil and meal fromLesquerella

fendleri seed. Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 67, n. 7, p. 438-442, 1990.

CASTRO, A. M. et al. **Processo de produção de lipases a partir de resíduo agroindustrial**.Brasil, 2009.

CASTRO, A. M. et al. Processo integrado para produção de biodiesel a partir de óleos ácidos empregando reação catalisada por enzimas de sólido fermentado, 2014.

CAVALCANTE, I. M. et al. Synthesis and characterization of new esters of oleic acid and glycerol analogues as potential lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 453–459, 2014.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. A. et al. Study of Soybean Oil Hydrolysis Catalyzed by Thermomyces lanuginosus Lipase and Its Application to Biodiesel Production via Hydroesterification. v. 2011, 2011.

CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D A. et al. Methods to prevent acidification of Macaúba (Acrocomia aculeata) fruit pulp oil: A promising oil foi producing biodiesel. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 703–707, 2015.

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Acetone powder from dormant seeds of Ricinus communis L: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 57–65, 2007.

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and diff erent polyols via esteri fi cation reaction catalyzed by immobilized lipase from Candida rugosa. **Fuel**, v. 215, n. October 2017, p. 705–713, 2018.

CERMAK, S. C. et al. Synthesis and physical properties of petroselinic based estolide esters. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 132–139, 2011.

CERMAK, S. C. et al. Synthesis and physical properties of new estolide esters. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 386–391, 2013.

CERMAK, S. C. et al. Synthesis and physical properties of pennycress estolides and esters. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 179–184, 2015a.

CERMAK, S. C. et al. Synthesis and physical properties of new coco-oleic estolide branched esters. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 171–177, 2015b.

CERMAK, S. C.; BRANDON, K. B.; ISBELL, T. A. Synthesis and physical properties of estolides from lesquerella and castor fatty acid esters. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 54–64, 2006.

CERMAK, S. C.; ISBELL, T. A. Physical properties of saturated estolides and their 2-ethylhexyl esters. **Industrial Crops and Products**, v. 16, n. 16, p. 119–127, 2002a.

CERMAK, S. C.; ISBELL, T. A. Pilot-plant distillation of meadowfoam fatty acids. **Industrial Crops and Products**, v. 15, p. 145–154, 2002b.

CERMAK, S. C.; ISBELL, T. A. Improved oxidative stability of estolide esters. **Industrial Crops** and **Products**, v. 18, p. 223–230, 2003.

CERMAK, S. C.; ISBELL, T. A. Synthesis and physical properties of mono-estolides with varying chain lengths. **Industrial Crops and Products**, v. 29, p. 205–213, 2009.

CERMAK, S. C.; ISBELL, T. A. . Biodegradable oleic estolide ester having saturated fatty acid end group useful as lubricant base stockUSA, 1990.

CERMAK, S. C.; ISBELL, T. A. . **BIODEGRADABLE OLEIC ESTOLIDE ESTER HAVING SATURED FATTY ACID END GROUP USEFUL LUBRICANT BASE STOCK**Estados Unidos, 2001.

CHERUKUVADA, S. L. et al. Evidence of a Double-Lid Movement in Pseudomonas aeruginosa Lipase: Insights from Molecular Dynamics Simulations. **Plos computacional biology**, v. 1, n. 3, p. e28, 2005.

CLARILUB. **História da lubrificação**. Disponível em: http://www.clarilub.com.br. Acesso em: 12 mar. 2018.

COSTA, B. Z. DA. "Versatilidade Enzimática: Triagem, Promiscuidade e Inibição de Enzimas. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2011.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational fexibility of Candida rugosa lipase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1441, p. 205–214, 1999.

DA SILVA, J. A. C. et al. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, p. 323–329, 2015.

DA SILVA, J. A. C.; FREIRE, D. M. G. José André Cavalcanti da Silva Denise Maria Guimarães Freire. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. [s.l: s.n.]. p. 471–502.

DA SILVA, J. A. C.; HABERT, A. C.; FREIRE, D. M. G. A potential biodegradable lubricant from castor biodiesel esters. **Lubrication Science**, v. 25, p. 53–61, 2013.

DALMAU, E. et al. Effect of different carbon sources on lipase production by Candida rugosa. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 657–663, 2000.

DE CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Quimica Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

DE SOUSA, J. S. et al. Application of lipase from the physic nut (Jatropha curcas L.) to a new hybrid (enzyme/chemical) hydroesterification process for biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 65, n. 1–4, p. 133–137, 2010.

DICZFALUSY, M. A.; ALEXSON, S. E. H. Isolation and Characterization of Novel Long-Chain Acyl-CoA Thioesterase/Carboxylesterase Isoenzymes from Candida rugosa. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 334, n. 1, p. 104–112, 1996.

DO BRASIL, N. I. et al. Os derivados do petróleo. In: **Processamento de Petroleo e Gás**. 2a edição ed. [s.l.] PETROBRAS, 2012. p. 274.

DOLL, K. M. et al. Derivatization of castor oil based estolide esters: Preparation of epoxides and cyclic carbonates. **Industrial Crops and Products**, v. 104, p. 269–277, 2017.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Understanding Candida rugosa lipases: An overview. **Biotechnology Advances**, v. 24, p. 180–196, 2006a.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P. et al. Acyl transfer strategy for the biocatalytical characterisation of Candida rugosa lipases in organic solvents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 199–208, 2006b.

DÖRMO, N. et al. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 229–234, 2004.

DUARTE, J. G. et al. Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography. **Fuel**, v. 177, p. 123–129, 2016.

EHRAN, S. Z. et al. Lubricant Base Stock Potential of Chemically Modified Vegetable Oils. J. Agric. Food Chem., v. 56, p. 8919–8925, 2008.

EICHOLZ, E. D.; SILVA, S. D. DOS A. E. Qualidade de sementes de mamona em função da época de semeadura e ordem de racemo. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 33, n. 2, p. 261–271, 2011.

ERHAN, S.; PEREZ, J. M. Biobased Industrial Fluids and Lubricants. **AOCS Press**, p. 46–58, 2002.

FERNANDES, K. V. et al. Simultaneous allergen inactivation and detoxification of castor bean cake by treatment with calcium compounds. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research on line**, v. 45, p. 1002–1010, 2012.

FERNANDES, M.; MILAGRES, A.; MUSSATTO, S. Enzimas - Poderosa Ferramenta na Indústria. **Ciência Hoje**, v. 41, n. April, p. 28–33, 2007.

FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 90–96, 2017.

FERREIRA-LEITÃO, V. et al. The Protagonism of Biocatalysis in Green Chemistry and Its Environmental Benefits. **Catalysts**, v. 7, n. 1, p. 9, 2017.

FERRER, P. et al. Production of Native and Recombinant Lipases by Candida rugosa. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 95, p. 221–255, 2001.

FERRER, P. et al. Recombinant Candida rugosa LIP2 expression in Pichia pastoris under the control of the AOX1 promoter. **Biochemical Engineering Journal**, v. 46, p. 271–277, 2009.

Food and drug administration. Guide for industry Q3C.

FOX, N. J.; STACHOWIAK, G. W. Vegetable oil-based lubricants-A review of oxidation. **Tribology International**, v. 40, p. 1035–1046, 2007.

GARCÍA-ZAPATEIRO, L. 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**, v. 115, n. 10, p. 1173–1182, 2013a.

GARCÍA-ZAPATEIRO, L. A. et al. Viscous, thermal and tribological characterization of oleic and ricinoleic acids-derived estolides and their blends with vegetable oils. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, p. 1289–1298, 2013b.

GARCÍA-ZAPATEIRO, L. 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**, v. 115, n. 10, p. 1173–1182, 2013c.

GARCÍA-ZAPATEIRO, L. A.; VALENCIA, C.; FRANCO, J. M. Formulation of lubricating greases from renewable basestocks and thickener agents: A rheological approach. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 115–121, 2014.

GODOY, M.G.; GUTARRA, M.L.E.; MACIEL, F.M.; FELIX, S.P.; BEVILAQUA, J.V.; MACHADO, O.L.T.; FREIRE, D. M. G. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 317–322, 2009.

GODOY, M. G. et al. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from Penicillium simplicissimum in castor bean waste. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 38, p. 945–953, 2011.

GODOY, M. G. et al. Use of Vero cell line to verify the biodetoxification efficiency of castor bean waste. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 578–584, 2012.

GOMES, N. et al. Impact of lipase-mediated hydrolysis of castor oil on γ-decalactone production by yarrowia lipolytica. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, n. 8, p. 1131–1137, 2013.

GOSWAMI, D. et al. Surfactant enhanced ricinoleic acid production using Candida rugosa

lipase. Bioresource Technology, v. 101, p. 6–13, 2010.

GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; VICENTE, G. Use of lipases in organic synthesis. In: **Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications**. [s.l: s.n.]. p. 301–315.

GRECO-DUARTE, J. et al. Two-step enzymatic production of environmentally friendly biolubricants using castor oil: Enzyme selection and product characterization. **Fuel**, v. 202, p. 196–205, 2017.

GRYGLEWICZ, S.; MUSZYŃSKI, M.; NOWICKI, J. Enzymatic synthesis of rapeseed oil-based lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 25–29, 2013.

GUTARRA, M. L. E. et al. Production of an acidic and thermostable lipase of the mesophilic fungus Penicillium simplicissimum by solid-state fermentation. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5249–5254, 2009.

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, 2014a.

HAJAR, M.; VAHABZADEH, F. Artificial neural network modeling of biolubricant production using Novozym 435 and castor oil substrate. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 430–438, 2014b.

HAYES, D. G. The catalytic activity of lipases toward hydroxy fatty acids - A review. **JAOCS**, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 5, p. 543–549, 1996.

HAYES, D. G.; KLEIMAN, R. Lipase-catalyzed synthesis and properties of estolides and their esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 11, p. 1309–1316, 1995.

HERMANSYAH, H. et al. Kinetic Model for Triglyceride Hydrolysis Using Lipase: Review. **MAKARA of Technology Series**, v. 11, n. 1, 2007.

HOLLIDAY, R. L.; KING, J. W.; LIST, G. R. Hydrolysis of vegetable oils in sub- and supercritical water. **Ind Eng Chem Res**, v. 36, n. 3, p. 932–935, 1997.

HONARY, L. A. T. Biolubricants: A global Overview. AOCS Inform, v. 20, n. 4, p. 256–259,

2009.

HONARY, L. A. T.; RICHTER, E. **Biobased Lubricants and Greases**. 1° edição ed. [s.l.] Willey, 2011.

HSIEN, W. L. Y. Uitlization of vegetable oil as biolubricant and additive. **Towards Green Lubrification in Machining**, v. Chapter 2, n. XIII, p. 46 p., 2015.

HULT, K.; BERGLUND, P. Enzyme promiscuity: mechanism and applications. **Trends in Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 231–238, 2007.

ISBELL, T. A. et al. Physical properties of triglyceride estolides from lesquerella and castor oils. **Industrial Crops and Products**, v. 23, p. 256–263, 2006.

ISBELL, T. A. Chemistry and physical properties of estolides. **Grasas y aceites**, v. 62, n. 1, p. 8–20, 2011.

ISBELL, T. A. . et al. Biodegradable oleic estolide ester base stocks and lubricants USA, 2000.

ISBELL, T. A. .; ABBOTT, T. P. .; LOHR JR., J. E. . **BIODEGRADABLE OLEIC ESTOLIDE ESTER BASE STOCKS AND LUBRICANTS**Estados Unidos, 1991.

ISBELL, T. A.; ABBOTT, T. P.; CARLSON, K. D. Oxidative stability index of vegetable oils in binary mixtures with meadowfoam oil. **Industrial Crops & Products**, v. 9, p. 115–123, 1999.

ISBELL, T. A.; CERMAK, S. C. Purification of meadowfoam monoestolide from polyestolide. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 113–118, 2004.

ISBELL, T. A.; EDGCOMB, M. R.; LOWERY, B. A. Physical properties of estolides and their ester derivatives. **Industrial Crops and Products**, v. 13, n. 1, p. 11–20, 2001.

JAEGER, K. -E et al. Bacterial lipases. FEMS Microbiology Reviews, v. 15, n. 1, p. 29–63, 1994.

JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315–351, 1999.

JAEGER, K.; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 13, p. 390–397, 2002.

JAEGER, K.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **TIBTECH**, v. 16, p. 396–403, 1998.

JIANG, Y. et al. Different Active-Site Loop Orientation in Serine Hydrolases versus Acyltransferases. **ChemBioChem**, v. 12, n. 5, p. 768–776, 2011.

JÚNIOR, C. L. C. et al. Produção de biolubrificantes derivados do óleo de mamona, 2011.

KANIA, D. et al. A review of biolubricants in drilling fluids: Recent research, performance, and applications. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 135, p. 177–184, 2015.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, 2012.

KHASKHELI, A. A. et al. Monitoring the Rhizopus oryzae lipase catalyzed hydrolysis of castor oil by ATR-FTIR spectroscopy. **J Mol Catal B Enzym**, v. 113, p. 56–61, 2015.

KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvens. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 14, p. 141–144, 1989.

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

LAGUERRE, M. et al. Regioselectivity and fatty acid specificity of crude lipase extracts from Pseudozyma tsukubaensis, Geotrichum candidum and Candida rugosa; Regioselectivity and fatty acid specificity of crude lipase extracts from Pseudozyma tsukubaensis, Geotrichum candid. European Journal of Lipid Science and Technology, 2017.

LÄMSA, M. Environmentally Friendly Products Based on Vegetable Oils. [s.l.] Helsinki University of Technology, 1995.

LEPAGE, G.; ROY, C. C. Direct tensesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. **Journal of lipid research**, v. 27, p. 114–120, 1986.

LUNDELL, K.; RAIJOLA, T.; KANERVA, L. T. Enantioselectivity of Pseudomonas cepacia and

Candida rugosa lipases for the resolution of secondary alcohols: The effect of Candida rugosa isoenzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 22, p. 86–93, 1998.

MACEDO, F. C. O. et al. **PRODUÇÃO DE MUDAS DE MAMONEIRA (Ricinus communis L.) A PARTIR DA ESTIMULAÇÃO DE ESTACAS PELO ÁCIDO 3-INDOLACÉTICO (AIA) E PELO ÁCIDO INDOL BUTÍRICO (AIB)**. 2° Congresso Brasileiro de Mamona. **Anais**...Aracaju (SE): 2006

MADANHIRE, I.; MBOHWA, C. Mitigating environmental impact of petroleum lubricants. **Mitigating Environmental Impact of Petroleum Lubricants**, n. Freedonia 2013, p. 1–239, 2016.

MAHER, K. D.; BRESSLER, D. C. Pyrolysis of triglyceride materials for the production of renewable fuels and chemicals. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 12, p. 2351–2368, 2007.

MAKKONEN, I. Environmentally Compatible Oils. Feri ed. Quebec, Canada: [s.n.].

MALHOTRA, D.; MUKHERJEE, J.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed transesterification of castor oil by straight chain higher alcohols. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2015.

MANCHEÑO, J. M. et al. Structural insights into the lipase/esterase behavior in the Candida rugosa lipases family: Crystal structure of the lipase 2 isoenzyme at 1.97 ?? resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 332, p. 1059–1069, 2003.

MCKEON, T. A. et al. Industrial oil crops. Elsevier ed. Londres: AOCS PRESS, 2016.

MCNUTT, J.; HE, Q. Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 36, p. 1–12, 2016.

MERJA LÄMSÄ, M. et al. **ENZYMATIC PROCESS FOR PREPARING A SYNTHETIC ESTER FROMAWEGETABLE OIL**USA, 1998.

MILANI, M.; COUTINHO, MÁRCIA B. M. NÓBREGA SUASSUNA, N. D.; COUTINHO, W. M. Resistência da Mamoneira (Ricinus communis L.) ao Mofo Cinzento Causado por Amphobotrys ricini. Campina Grande, PB: [s.n.].

MIRACEMA-NUODEX, I. Q. **LIOVAC 4252**. Disponível em: <www.miracema-nuodex.com.br/produtos>. Acesso em: 21 mar. 2018.

MMA; CONAMA. **Resolução CONAMA 362/2005**, 2005. Disponível em: www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res36205.xml acesso em 27/02/2018>

MOBARAK, H. M. et al. The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 33, p. 34–43, 2014.

MOULONGUI, Z.; PELET, S. Study of the acyl transfer reaction: Structure and properties of glycerol carbonate esters Research Paper. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 103, p. 216–222, 2001.

MOULOUNGUI, Z.; PELET, S. Study of the acyl transfer reaction: Structure and properties of glycerol carbonate esters Research Paper. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 103, p. 216–222, 2001.

NAGENDRAMMA, P.; KAUL, S. Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 764–774, 2012.

NETO, S. C. **Usos e Aplicações do Óleo de Mamona Castor Oil Ricinus communis**. Disponível em: http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/mamona/publicacoes/>.

NIE, Y. et al. High-yield conversion of (R)-2-octanol from the corresponding racemate by stereocon- version using Candida rugosa. **Biotechnol Lett**, v. 27, p. 23–26, 2005.

NOOR, I. .; HASAN, M.; RAMACHANDRAN, K. . Effect of operating variables on the hydrolysis rate of palm oil by lipase. **Process Biochemistry**, v. 39, n. 1, p. 13–20, 30 set. 2003.

OH, J. et al. Synthesis of biolubricants using sulfated zirconia catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 455, p. 164–171, 2013.

ORI-JESU, A.; ORI-JESU, M. Biodegradation of mineral oils – A review. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 6, p. 915–920, 2009.

PADMAJA, K. V et al. 10-Undecenoic acid-based polyol esters as potential lubricant base stocks. **Industrial Crops & Products**, v. 35, n. 1, p. 237–240, 2012.

PALOMO, J. M. et al. Purification, Immobilization, Hyperactivation and Stabilization of Lipases by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports. In: GUISAN, J. M. (Ed.). . **Methods in**

Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells. [s.l: s.n.]. p. 143–152.

PANCHAL, T. M. et al. A methodological review on bio-lubricants from vegetable oil based resources. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 70, n. October 2015, p. 65–70, 2017.

PAQUES, F. W.; MACEDO, G. A. Lipases de látex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 93–99, 2006.

PELAEZ, M. et al. Natural estolides produced by Pseudomonas sp. 42A2 grown on oleic acid: Production and characterization. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 9, p. 859–866, 2003.

PENOYER, C. E.; VON FISHER, W.; BOBALEK, E. G. Synthesis of Drying Oils by Thermal Splitting of Secondary Fatty Acid Esters of Castor Oil. **Journal of american oil chemistry society**, v. 31, p. 366–370, 1954.

PEREIRA JR., N.; BON, E. P. DA S.; FERRARA, M. A. **Séries em Biotecnologia:Tecnologia de Bioprocessos**. [s.l: s.n.]. v. I

PETRAN, J. et al. Biolubricants From Natural Waste Oils and Fats. **Gomabn**, v. 47, n. 6, p. 463–478, 2008.

PETROVIC, Z. S. Polyurethanes from Vegetable Oils. **Polymer Reviews**, v. 48, p. 109–155, 2008.

POTULA, S. B. et al. CASTOR OIL FATTY ACID BASED ESTOLIDE ESTERS AND THEIRDERVATIVES AS POTENTIAL LUBRICANT BASE STOCKS, 2014.

PULLEN, J.; SAEED, K. An overview of biodiesel oxidation stability. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 8, p. 5924–5950, 2012.

QUINCHIA, L. A. et al. Tribological studies of potential vegetable oil-based lubricants containing environmentally friendly viscosity modifiers. **Tribology International**, v. 69, p. 110–117, 2014.

RICCARDI, L. et al. Lid domain plasticity and lipid flexibility modulate enzyme specificity in

human monoacylglycerol lipase. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1862, n. 5, p. 441–451, 2017.

ROCCO, C. et al. **RELATÓRIO TÉCNICO Nº 2 / 2016 / SBQ / CPT – DF PANORAMA DOS ÓLEOS BÁSICOS NO BRASIL.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <file:///C:/Users/cliente/Dropbox/Doutorado/Defesa/ANP-RELATORIO-TECNICO-2-2016-SBQ-CPT-DF-PANORAMA-DOS-OLEOS-BASICOS-NO-BRASIL.pdf>.

RODRIGUES, R. C. et al. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6290–6307, 2013.

RODRIGUES, R. C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Coupling chemical modification and immobilization to improve the catalytic performance of enzymes. **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 353, p. 2216–2238, 2011.

ROIZ, J. Biolubricants: technical and market survey, 2011.

ROMANO, D. et al. Esterases as stereoselective biocatalysts. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 547–565, 2015.

RUDNICK, L. R. Synthetics, Mineral Oils, and Bio-Based Lubricants – Chemistry and Technology. Second edi ed. [s.l.] CRC Press, 2006.

RUEPING, M.; NACHTSHEIM, B. J. A review of new developments in the Friedel – Crafts alkylation – From green chemistry to asymmetric catalysis. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 6, p. 1–24, 2010.

SALIH, N.; SALIMON, J.; YOUSIF, E. The physicochemical and tribological properties of oleic acid based triester biolubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 34, p. 1089–1096, 2011.

SALIMON, J. et al. Synthesis and Physical Properties of Estolide Ester Using Saturated Fatty Acid and Ricinoleic Acid. **Journal of Automated Methods and Management in Chemistry**, v. 2011, p. 1–4, 2011.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B. M.; SALIH, N. Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from Jatropha curcas seed oil. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 67, 2011.

SALIMON, J.; SALIH, N. Modification of epoxidized ricinoleic acid for biolubricant base oil with improved flash and pour points. **Asian J. Chem**, v. 22, p. 5468–5476, 2010.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Improvement of pour point and oxidative stability of synthetic ester basestocks for biolubricant applications. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 5, p. 193–200, 2012a.

SALIMON, J.; SALIH, N.; YOUSIF, E. Biolubricant basestocks from chemically modified ricinoleic acid. **Journal of King Saud University - Science**, v. 24, n. 1, p. 11–17, 2012b.

SÁNCHEZ, A. et al. A controlled fed-batch cultivation for the production of new crude lipases from Candida rugosa with improved properties in fine chemistry. **Journal of Biotechnology**, v. 69, p. 169–182, 1999.

SATYARTHI, J. K.; SRINIVAS, D.; RATNASAMY, P. Hydrolysis of vegetable oils and fats to fatty acids over solid acid catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 391, n. 1–2, p. 427–435, 2011.

SAVY FILHO, A. et al. IAC-2028: Nova cultivar de mamona. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 3, p. 449–452, 2007.

SECUNDO, F. et al. The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. v. 39, p. 166–170, 2006.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Sharma et al 2001 Production purification characterization and applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SILVA, J. A. C. DA. Obtenção de um lubrificante biodegradável a parter de ésteres do biodiesel da mamona via catálise enzimática e estudos de estabilidade oxidativa e térmica. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

SOARES, R. M. Avaliação técnica, mercadológica e de tendências da utilização de óleos lubrificantes de base vegetal. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013a.

SOARES, R. M. Avaliação técnica, mercadológica e de tendências da utilização de óleos lubrificantes de base vegetal. v. Dissertaçã, 2013b.

SOUZA, M. S. et al. Biodiesel synthesis via esterification of feedstock with high content of free fatty acids. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 154, n. 1–3, p. 253–267, 2009.

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

SYAIMA, M. T. S. et al. The synthesis of bio-lubricant based oil by hydrolysis and non-catalytic of palm oil mill effluent (POME) using lipase. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p. 669–675, 2015.

TABARELLI, G. Síntese de tioéteres alílicos a partir de álcoois alílicos e tióis sem o uso de solvente e catalisadores sob irradiação de micro-ondas. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

TAMBASCIA, M. B.; TEIXEIRA, J. P. F. Mamona: Determinação quantitativa do teor de óleo. **Bragantia**, v. 45, n. 1, p. 23–27, 1986.

TODEA, A. et al. Selectivity of lipases for estolides synthesis. **Pure and Applied Chemistry**, v. 87, n. 1, p. 51–58, 2015.

TRIVEDI, J. et al. Clean synthesis of biolubricant range esters using novel liquid lipas e enzyme in solvent free medium. **Springer plus**, v. 4, 2015.

USP. História do Petróleo. Disponível em: http://cepa.if.usp.br>. Acesso em: 12 mar. 2018.

VALERO, M. F.; GONZALEZ, A. Polyurethane adhesive system from castor oil modified by a transesterification reaction. **Journal of Elastomers and Plastics**, v. 44, n. 5, p. 433–442, 2012.

VOLPATO, G. PRODUÇÃO, PURIFICAÇÃO E IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES DE Staphylococcus warneri EX17 PRODUZIDAS EM GLICEROL. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

WAGNER, H.; LUTHER, R.; MANG, T. Lubricant base fluids based on renewable raw materials: Their catalytic manufacture and modification. **Applied Catalysis A: General**, v. 221, n. 1–2, p. 429–442, 2001.

WANG, G.; SUN, S. Synthesis of Ricinoleic Acid Estolides by the Esterification of Ricinoleic

Acids Using Functional Acid Ionic Liquids as Catalysts. **Journal of oleo science**, v. 759, n. 7, p. 753–759, 2017.

WEARCONTROL. **A história do Óleo lubrificante**. Disponível em: https://www.wearcontrol.com.br/. Acesso em: 12 mar. 2018.

WOLFF, R. L.; BAYARD, C. C.; FABIEN, R. J. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on trans-18:1 acids. Application to the study of seasonal variations in french butters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 12, p. 1471–1483, 1995.

WU, Y. et al. Improvement of oxidative stability of trimethylolpropane trioleate lubricant. **Thermochimica Acta**, v. 569, p. 112–118, 2013.

YAHYA, A. R. M.; ANDERSON, W. A.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase catalyzed reactions. **Enzyme Microb. Technol**, v. 23, p. 438–450, 1998.

YAO, L. et al. Synthesis and physical properties of potential biolubricants based on ricinoleic acid. **JAOCS**, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 87, p. 937–945, 2010.

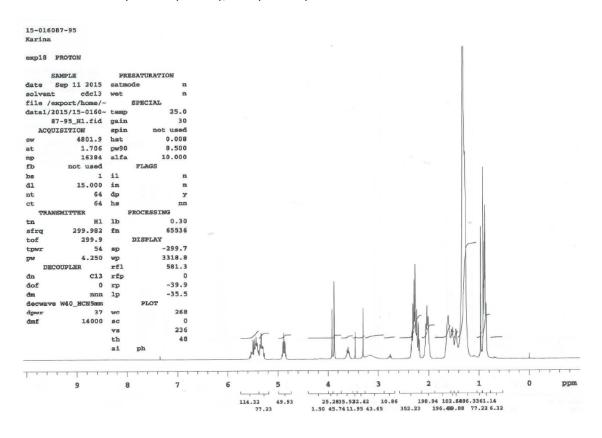
YOSHIDA, YASUKO; MITSUO, KAWASE; CHOZO, Y. **PRODUCTION OF ESTOLIDE FROM RICINOLEIC ACID-patente.pdf**European Patent office, , 1993.

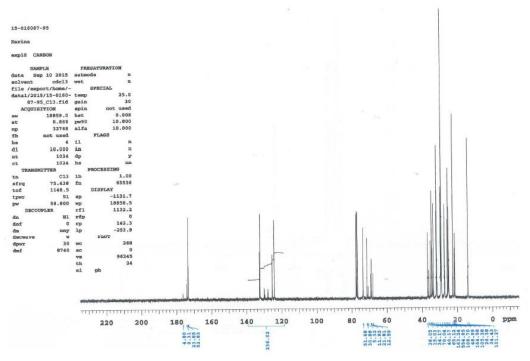
YOSHIDA, Y. et al. Enzymatic synthesis of estolides by a bioreactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 261–267, 1997.

ZINNI, M. A. et al. Optimization of the lipase-catalysed preparation of a nucleoside prodrug model using an experimental design methodology. **Quimica Nova**, v. 27, n. 3, p. 496–498, 2004.

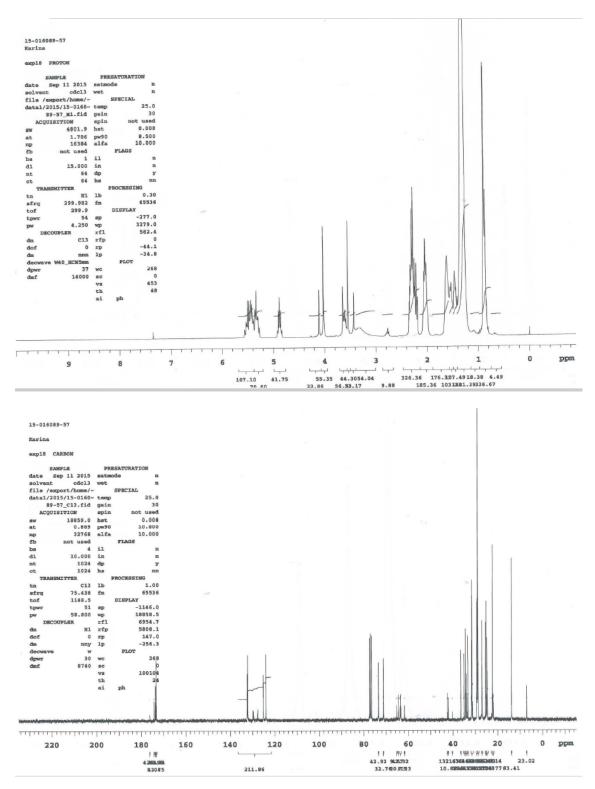
Anexos Capítulo 6

Espectros de RMN provenientes do produto da reação de AGLM e NPG (metodologia descrita em 6.11) de ¹H (acima), ¹³C (abaixo).

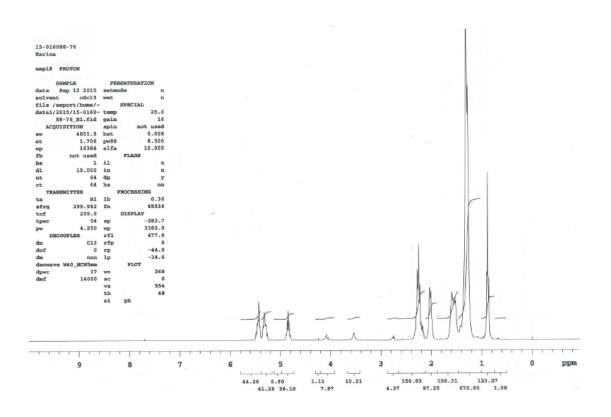


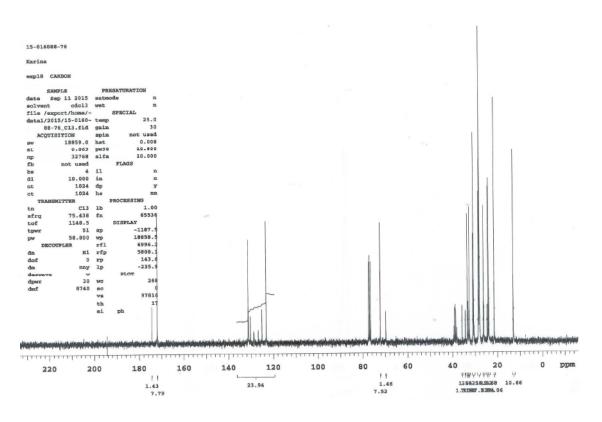


Espectros de RMN provenientes do produto da reação de AGLM e TMP (metodologia descrita em 6.11) de ¹H (acima), ¹³C (abaixo).

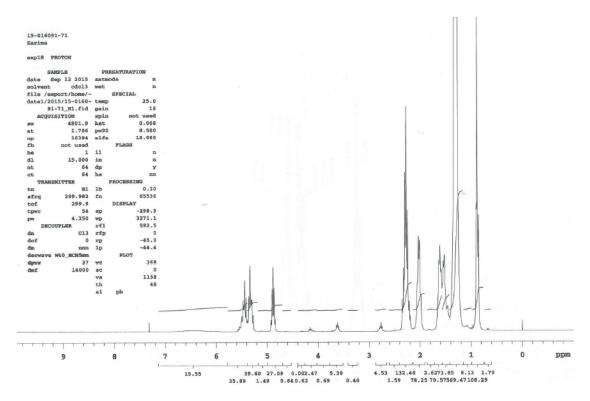


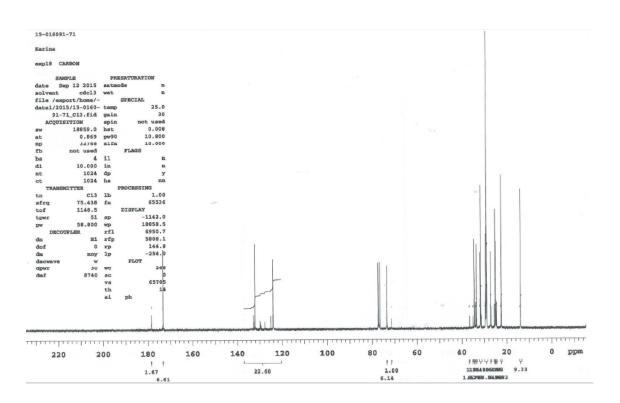
Espectros de RMN provenientes do produto da reação de AGLM e PE (metodologia descrita em 6.11) de ¹H (acima), ¹³C (abaixo).



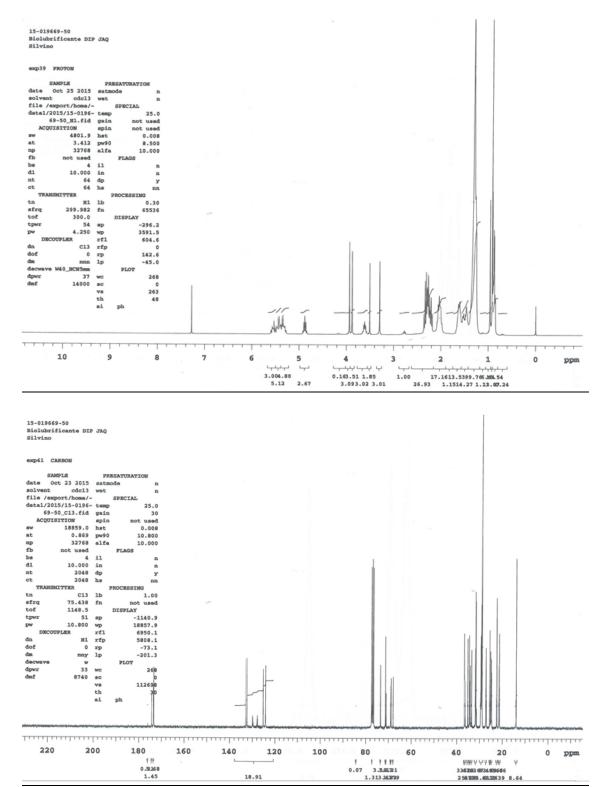


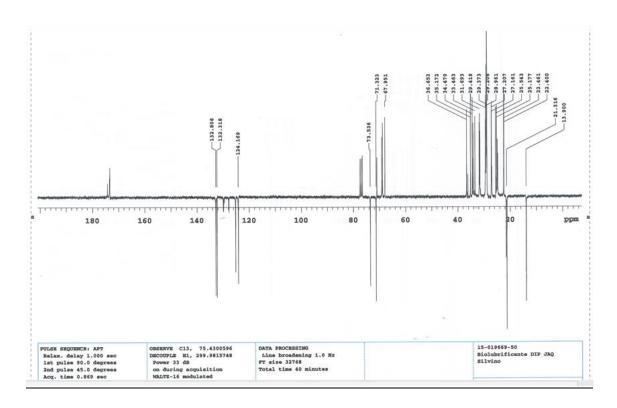
Espectros de RMN provenientes do produto da reação de polimerização do AGLM (metodologia descrita em 6.11) de ¹H (acima), ¹³C (abaixo).



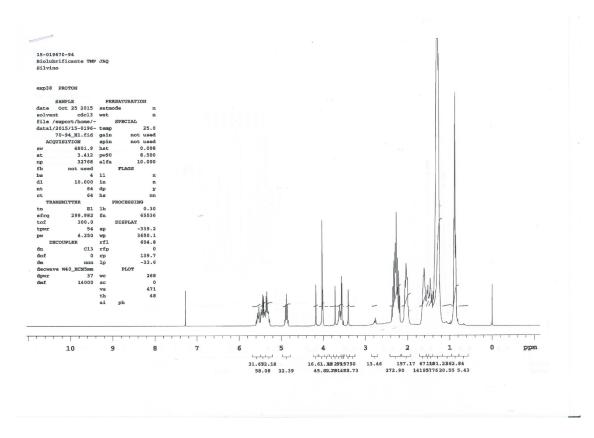


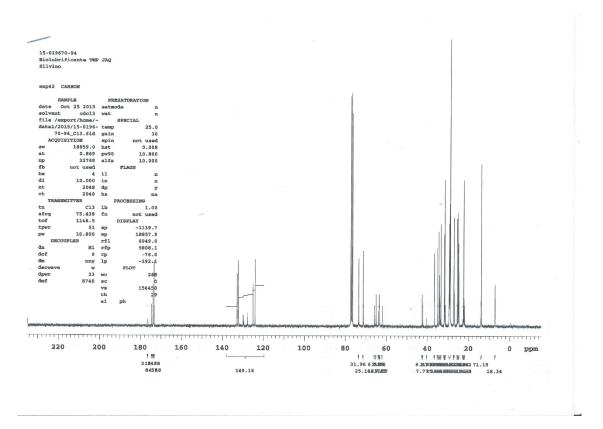
Espectros de RMN provenientes do produto da reação de AGLM e NPG após solubilização (metodologia descrita em 6.12) de ¹H (acima), ¹³C (meio) e ¹³C APT (abaixo)

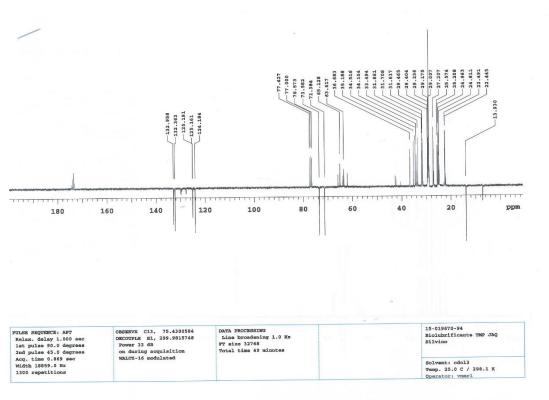




Espectros de RMN provenientes do produto da reação de AGLM e NPG após solubilização (metodologia descrita em 6.12) de ¹H (acima), ¹³C (meio) e ¹³C APT (abaixo)

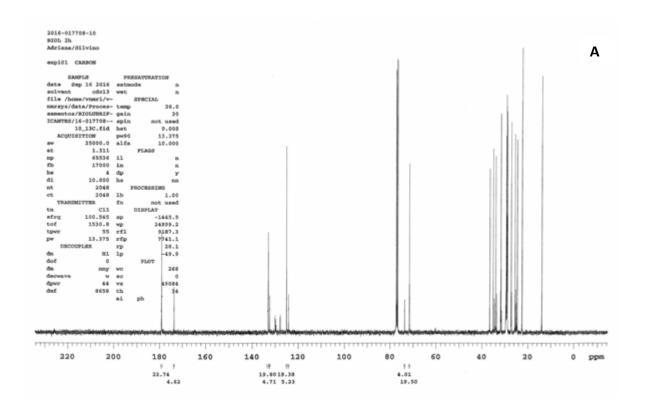


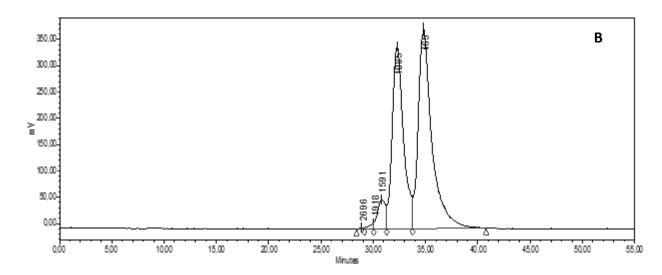




Anexos Capítulo 7

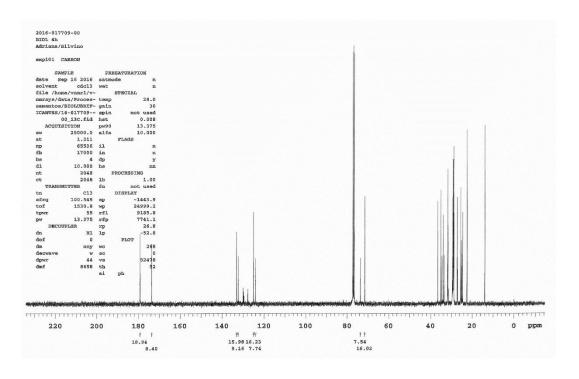
Espectro de RMN de ¹³C experimental de 2 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 2 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 0,2**; sugerindo presença de "alta concentração de" ARL. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C-) e 71,5ppm (-C-OH).





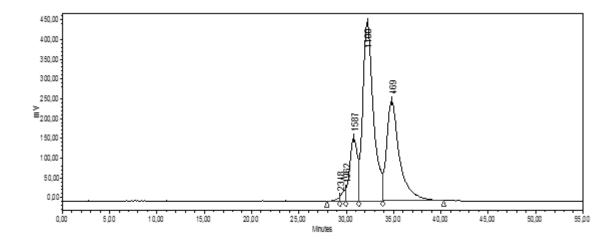
Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	0,1
PICO 2	Tetrâmeros	0,5
PICO 3	Trímeros	4,7
PICO 4	Dímeros	40,5
PICO 5	Monômeros	54,2

Espectro de RMN de ¹³C experimental de 4 h (A). Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 4 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 0,5**; sugerindo presença de "alta concentração de" ARL. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C) e 71,5ppm (-C-OH) (3A).



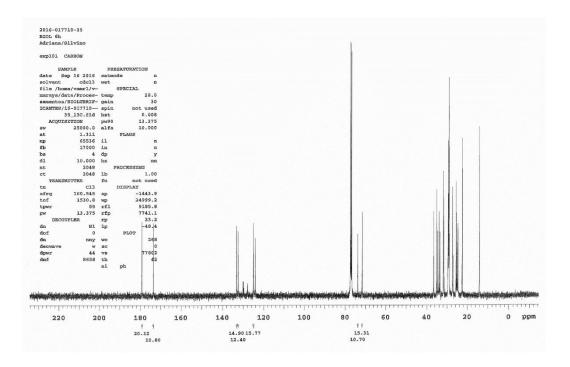
Α

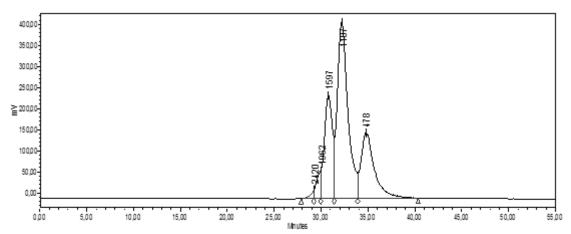




Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	0,4
PICO 2	Tetrâmeros	1,2
PICO 3	Trímeros	13,1
PICO 4	Dímeros	50,8
PICO 5	Monômeros	34,5

Espectro de RMN de ¹³C experimental de 6 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 6 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 0,7**; sugerindo presença "alta concentração de" ARL. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C) e 71,5ppm (-C-OH).





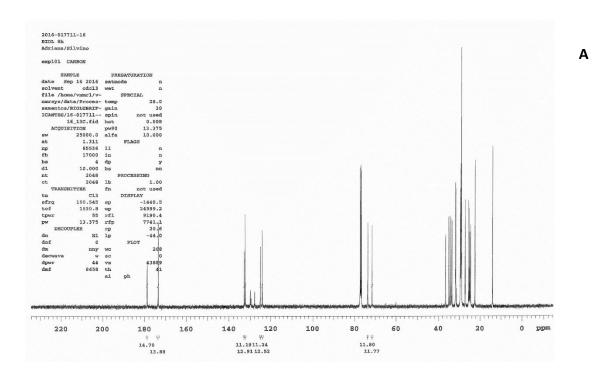
Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	0,7
PICO 2	Tetrâmeros	3,1
PICO 3	Trímeros	22,3
PICO 4	Dímeros	50,5
PICO 5	Monômeros	23,4

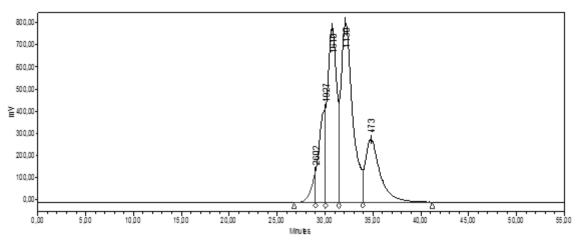
Espectro de RMN de ¹³C experimental de 8 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 8 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 1,0**; sugerindo

Α

В

presença de "alta concentração de" ARL; e entre os oligômeros, os dímeros são majoritários. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C-) e 71,5ppm (-C-OH).

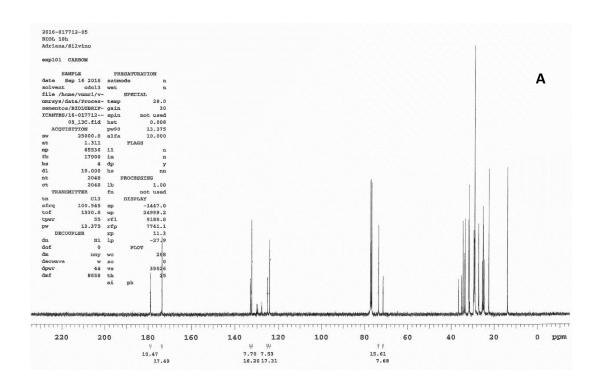




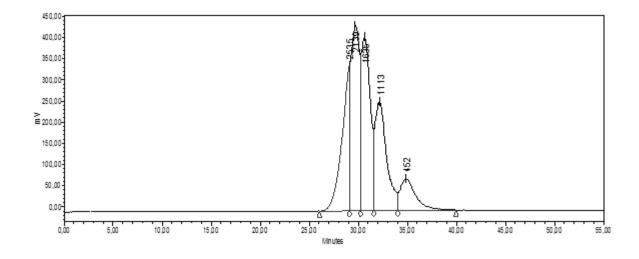
В

Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	2,4
PICO 2	Tetrâmeros	10,7
PICO 3	Trímeros	29,9
PICO 4	Dímeros	39,4
PICO 5	Monômeros	17,6

Espectro de RMN de ¹³C experimental de 10 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 10 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 2,0**; sugerindo presença de "baixa concentração de" ARL; e entre os oligômeros, os trímeros são majoritários. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C-) e 71,5ppm (-C-OH).

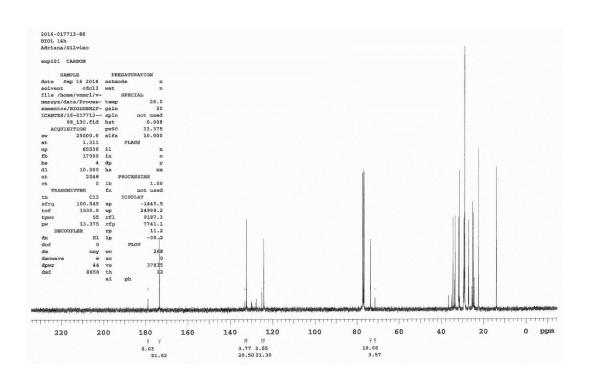


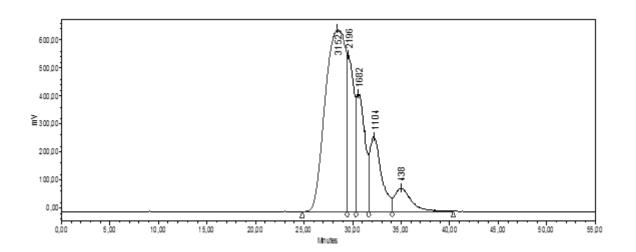




Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	17,3
PICO 2	Tetrâmeros	26,9
PICO 3	Trímeros	26,6
PICO 4	Dímeros	21,1
PICO 5	Monômeros	8,1

Espectro de RMN de ¹³C experimental de 14 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 14 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 5,5**; sugerindo presença de "baixa concentração de" ARL; e entre os oligômeros, os hexâmeros são majoritários. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C-) e 71,5ppm (-C-OH).

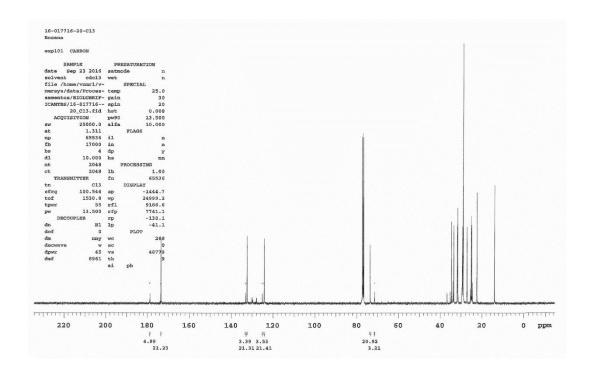




Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	52,8
PICO 2	Tetrâmeros	14,6
PICO 3	Trímeros	14,6
PICO 4	Dímeros	12,5
PICO 5	Monômeros	5,5

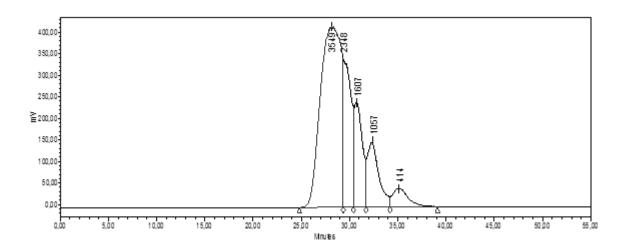
Α

Espectro de RMN de ¹³C experimental de 20 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 20 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 6,5**; sugerindo presença de "baixa concentração de" ARL; e entre os oligômeros, os heptâmeros são majoritários. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C-) e 71,5ppm (-C-OH).



В

Α



54,9
16,7
13,1
11,0
4,3

% Fração

Espectro de RMN de ¹³C experimental de 24 h (A); Cromatograma da reação de produção de estolídeos em 24 h e distribuição de oligômeros (B). Por RMN de ¹³C, **NE = 6,7**; sugerindo presença de "baixa concentração de" ARL; e entre os oligômeros, os heptâmeros são majoritários. O NE foi calculado com base nos sinais de dos sinais a 73,5ppm (-C-O-C-) e 71,5ppm (-C-OH).

Fração

Pentâmeros (+)

Tetrâmeros

Trímeros

Dímeros

Monômeros

Nome

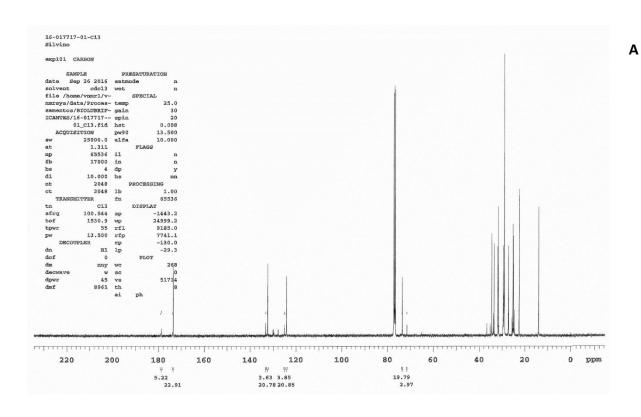
PICO 1

PICO 2

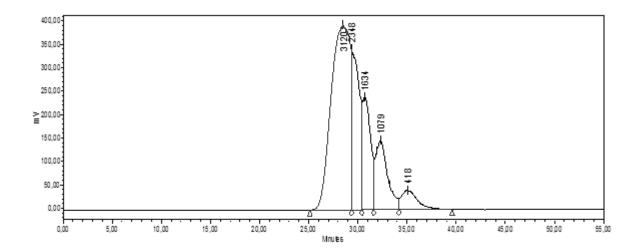
PICO 3

PICO 4

PICO 5







Nome	Fração	% Fração
PICO 1	Pentâmeros (+)	50,8
PICO 2	Tetrâmeros	18,4
PICO 3	Trímeros	13,5
PICO 4	Dímeros	12,7
PICO 5	Monômeros	4,6

Publicações