UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

KASSIA LEONE IGNACIO

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS DE SOJA UTILIZANDO LIPASE NÃO COMERCIAL DE *Rhizomucor miehei*

RIO DE JANEIRO

2020

Kassia Leone Ignacio

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS DE SOJA UTILIZANDO LIPASE NÃO COMERCIAL DE *Rhizomucor miehei*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Orientadores: Prof.ª. D.Sc. Denise Maria Guimarães Freire (IQ-UFRJ)

D.Sc. José André Cavalcanti da Silva (PETROBRAS)

Rio de Janeiro

2020

CIP - Catalogação na Publicação

Ignacio, Kassia Leone
I24p Produção de biolubrificante por transesterificação enzimática de ésteres metílicos de soja utilizando lipase não comercial de Rhizomucor miehei / Kassia Leone Ignacio. -- Rio de Janeiro, 2020.
164 f.

Orientadora: 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, 2020.

1. Biolubrificante. 2. Lipase. 3. Transesterificação. 4. Zimografia. 5. Biodiesel de Soja. I. Freire, Denise Maria Guimarães, orient. II. da Silva, José André Cavalcanti, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA DE ÉSTERES METÍLICOS DE SOJA UTILIZANDO LIPASE NÃO COMERCIAL DE *Rhizomucor miehei*

Kassia Leone Ignacio

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Bioquímica).

Aprovada por: _____

Profª. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc. – IQ-UFRJ (Orientadora)

_____

Dr. José André Cavalcanti da Silva, D.Sc – Petrobras (Orientador)

_____

Profª. Elis Cristina Araujo Eleutherio, D.Sc. – IQ-UFRJ

_____

Profª. Viridiana Santana Ferreira Leitão, D. Sc. – INT

_____

Prof. Mateus Gomes de Godoy, D. Sc. – IMPG-UFRJ

_____

Prof. Carlos Adam Conte Junior, D. Sc. – IQ-UFRJ

_____

Prof. Marco Di Luccio, D. Sc. – UFSC

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

ABRIL DE 2020

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever esta tese foi utilizar essas páginas para agradecer às pessoas que fizeram parte desta minha trajetória de 14 anos na Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Aos meus pais, agradeço em separado o trabalho em parceria:

Ao meu Pai por, dentro de todas as incoerências, ter fomentado a curiosidade e o escrutínio incessantes da infância e, sem qualquer senso das consequências, ter me incentivado a ser o que eu mais queria na vida, que era ser cientista.

À minha Mãe, que fez tudo o que podia para que pudéssemos estudar. Jamais poderei valorar o que sua abstenção de viver nos proporcionou.

Ao Afonsinho, meu irmão, pelo privilégio da parceria sem limites e de ter o melhor irmão do mundo.

Ao Daniel, meu namorado, meu presente, por ser esse grande companheiro de vida, com todo apoio, paciência e ternura.

À minha fofa, devota e louca família, por me apoiarem em (quase) todos os projetos em que me enfiei até hoje.

Às amigas Karinna e Betinha, que estão comigo desde sempre, e por mais outro motivo: o tempo torna ainda mais especial esse trio improvável (vocês eram uma boa dupla antes).

Ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica, que me aceitou em 2014 e que foi de extrema importância para minha formação como cientista.

Aos coordenadores da pós-graduação em Bioquímica Luciana e Anderson, e também aos professores Rodrigo, Vania, Mateus, Viridiana, Carlos, Elis, pelo apoio, incentivo e compreensão durante o corrido caminho para a realização desta defesa.

À Denise, minha orientadora, pelos ensinamentos valiosos, por buscar sempre a excelência acadêmica para o laboratório, e por não ter nunca desistido deste trabalho.

Aos colegas do laboratório mais badalado do CT: Joab, Carol, Maria Eduarda, Priscila, Jaqueline 1, Jaqueline 2, Elisa, Erika, Fábio, Douglas, Anderson, Taísa, Sabrini, Julia, Maisa e Ana. Agora com a "New Generation", ninguém segura esse voo (que por sorte e privilégio possui anciãos para o guiar).

Um abraço mais apertado ainda nas Jaques, na Érika, na Elisa, na Priscila, na Carol, na Madu e no Joab, pela convivência próxima e afável, indispensável à sobrevivência aos perrengues de bancada.

À Aline, que atua como secretária no LaBiM, mas que, para além da sua competência técnica, é de uma prestatividade e sensibilidade enormes, coisas que não são pré-requisitos para o cargo, mas que ela tem de sobra. Que sorte a nossa.

Ao José André, meu coorientador, que foi fundamental nas discussões que direcionaram as grandes etapas desse trabalho.

Ao Profº Lafuente, pelas observações sempre perspicazes e prestatividade.

À Petrobras-Cenpes, por fomentar o interesse por esta tese e por viabilizar técnica e estruturalmente várias das análises aqui demonstradas.

Ao meu afilhado, Guilherme, por ser o meu ponto de partida para redefinir os conceitos de tempo, saúde e afeto.

À amiga Vera, que desde 2006 ajuda a melhorar minha argumentação através da sua inconveniente capacidade de insistência. Nos últimos anos, porém, sossegou (um pouco) e se tornou uma grande companheira.

Aos meus amigos da Biologia, por ressignificarem o conceito de amizade nas suas infinitas formas.

Às criaturas quadrúpedes que habitaram a minha vida, enchendo-a da alegria genuína que hoje faz falta, mas que foi demais valiosa para os anos de tese: Panthera, Anne, (Charles) Darwin e Marie (a Curie). São donos de fotografias hipnotizantes, que facilmente tomariam todo o conteúdo desta tese sem que ninguém reclamasse.

À Capes, por conceder-me bolsa para realização deste doutorado, e por contribuir para a excelência docente através da permissão de atividade concomitante de docência.

Aos meus alunos, por provarem para mim a excelência por trás da célebre frase cunhada pelo Profº Carlos Chagas Filho, lida e ouvida todos os dias durante meus primeiros anos de Ciência no instituto fundado por ele: “só se ensina porque se pesquisa”.

“Se você tem conhecimento, deixe os outros acenderem as suas velas nele.”

Margaret Fuller (1810-1850)

RESUMO

LEONE-IGNACIO, Kassia. **Produção de biolubrificante por transesterificação enzimática de ésteres metílicos de soja utilizando lipase não comercial de *Rhizomucor miehei*.** Rio de Janeiro, 2020. Tese (Doutorado em Ciências - Bioquímica) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Os lubrificantes são produtos usados para redução de desgaste e corrosão, refrigeração e proteção de componentes móveis de motores e equipamentos. A classe de óleos sintéticos, tais como ésteres de poliois, constitui-se de moléculas produzidas por esterificação com álcoois alifáticos polihidroxilados. A conversão de óleos vegetais em poliol ésteres melhora sua estabilidade térmica e resistência à hidrólise. Todavia, o alto custo de enzimas comerciais limita a viabilidade econômica de suas aplicações. A utilização de enzimas produzidas por Fermentação em Estado Sólido (FES) de rejeitos agroindustriais representa uma alternativa de redução dos custos desses biocatalisadores. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é desenvolver biocatalisadores de baixo custo para a síntese de biolubrificantes, especificamente, com a lipase de *Rhyzomucor miehei*, por FES, e a obtenção de biolubrificantes por catálise enzimática. A FES foi conduzida em biorreatores do tipo bandeja, contendo torta de babaçu e esporos de *R. miehei*. O sólido fermentado liofilizado constitui o Preparado Enzimático Sólido (PES). As reações para síntese de biolubrificantes foram realizadas em reatores de vidro encamisados e sob agitação. Ao meio racional, composto de neopentilglicol (NPG), biodiesel de soja (BDS) e água, foi adicionado o PES (20% m/m). A síntese do biolubrificante foi medida pela porcentagem das hidroxilas do NPG esterificadas, determinando-se o teor de ésteres de biodiesel em cada alíquota reacional por cromatografia gasosa e o teor de ácidos graxos livres por titulometria de neutralização. Um primeiro estudo reacional com planejamento experimental do tipo delineamento central composto rotacional (DCCR) foi conduzido tendo como variáveis a razão molar, a temperatura e o teor de água. Os resultados apontaram como melhor combinação a razão molar de 3,1 mols de BDS para 1 mol de NPG, acrescida de 2,5% (%m/m) de água, com temperatura de 45 °C. O produto teve suas características físico-químicas bem avaliadas em análises conduzidas pelo CENPES. As cinéticas até 120h revelaram conversões que atingem 100% após 72h, sem modificação no percentual de acidez a partir disso. Conversões similares foram atingidas quando as reações foram catalisadas pela enzima comercial RM-IM (Lipozyme). Estudos de reutilização do PES demonstraram melhores

resultados quando o PES não foi submetido a lavagens com solvente. A adição de NPG ou etanol ao meio reacional após 72h de reação resultou no consumo dos ácidos graxos, tendo a adição do poliálcool favorecido tanto o consumo dos ácidos graxos quanto do biodiesel remanescente (apenas 1,5% de biodiesel não foi transesterificado ou hidrolisado). Os resultados desta tese chegaram a um produto com alto percentual de conversão e com boas propriedades físico-químicas, produzido por catálise enzimática utilizando um biocatalisador obtido a partir de cultivo em coprodutos agroindustriais.

Palavras-chave: Biolubrificantes; Lipase; Biodiesel de Soja; Fermentação em Estado Sólido; *Rhizomucor miehei*; Transesterificação.

ABSTRACT

LEONE-IGNACIO, Kassia. **Biolubricant production by enzymatic transesterification of soy methyl esters using non-commercial *Rhizomucor miehei* lipase.** Thesis (Doctor of Science - Biochemistry) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Lubricants are products used to reduce wear and corrosion, cooling and protection of movable engine components of and equipments. The class of synthetic oils, such as polyol esters, consists of molecules produced by esterification with polyhydroxylated aliphatic alcohols. Vegetable oils conversion into polyol esters improves their thermal stability and resistance to hydrolysis. However, the high cost of commercial enzymes limits the economic viability of their applications. The use of enzymes produced by Solid State Fermentation (SSF) of agro-industrial waste represents an alternative to reduce the biocatalysts costs. In this context, the objective of this work is to develop low cost biocatalysts for biolubricants synthesis, specifically, with *Rhyzomucor miehei* lipase, by SSF, and to obtain biolubricants by enzymatic catalysis. The SSF was conducted in tray-type bioreactors, containing babassu cake and *R. miehei* spores. The lyophilized fermented solid constitutes the Solid Enzyme Preparation (SEP). The synthesis reactions of biolubricants were carried out in jacketed glass reactors under agitation. SEP (20% w/w) was added to the rational medium, composed by neopentylglycol (NPG), soy biodiesel (SB) and water. The biolubricant synthesis was measured by the percentage of esterified NPG hydroxyls, determining the biodiesel esters content in each reaction aliquot by gas chromatography and the free fatty acids content by neutralization titrometry. A preliminary study by central composite rotational design (CCRD) was conducted with molar ratio, temperature and water content as variables. The results showed 188/5000

The results showed the best combination was molar ratio of 3.1:1 (BDS:NPG), plus 2.5% (% w/w) of water, and 45 ° C. The product was well evaluated concerning its physical-chemical characteristics in analyzes conducted by CENPES. The kinetics curves up to 120h revealed conversions of 100% after 72h, without changing the acidity from that. Similar conversions were achieved in reactions catalyzed by the commercial enzyme RM-IM (Lipozyme). SEP reuse have shown better results when SEP has not been subjected to solvent washes. The addition of NPG or ethanol to the reaction medium after 72 hours resulted in fatty acids consumption; the addition of polyalcohol favoring both fatty acids and remaining biodiesel

consumption (only 1.5% of biodiesel was not transesterified or hydrolyzed). The results of this thesis reached a product with a high percentage of conversion and good physical-chemical properties, produced by enzymatic catalysis using a biocatalyst obtained from cultivation in agroindustrial by-products.

Keywords: Biolubricants; Lipase; Soy Biodiesel; Solid State Fermentation; *Rhizomucor Miehei*; Transesterification.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. OBJETIVOS 4

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 5

3.1. LUBRIFICANTES: DEFINIÇÃO E DEMANDA 5
3.2. DEMANDA GLOBAL DE LUBRIFICANTES 7
3.3. MERCADO BRASILEIRO 10
3.4. AS BIORREFINARIAS E POLOS OLEOQUÍMICOS COMO ESTRATÉGIA PARA O MERCADO BRASILEIRO 14
3.5. CONTEXTUALIZAÇÃO DAS OLEAGINOSAS NO BRASIL 17
3.6. REJEITOS AGROINDUSTRIAIS E O BABAÇU 20
3.7. SUBSTÂNCIAS LUBRIFICANTES 23
3.7.1. POLIOL ÉSTERES 26
3.8. LIPASES 28
3.9. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) 31

4. MATERIAL E MÉTODOS 34

4.1. MICRO-ORGANISMO 34
4.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) PARA OBTENÇÃO DO PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO (PES) 34
4.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO 35
4.4. PROSPECÇÃO DE SUBSTRATOS POR ZIMOGRAFIA 35
4.5. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO O PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO DE *RHIZOMUCOR MIEHEI* COMO BIOCATALISADOR 36
4.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS 37
4.6.1. Medida da atividade de hidrólise 37
4.6.2. Determinação da atividade de esterificação do PES 38
4.6.3. Determinação da acidez das reações 39
4.6.4. Determinação do teor de ésteres metílicos 40
4.6.5. Conversão da reação de transesterificação 40
4.6.6. Planejamento experimental 41
4.7. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) PARA MONITORAMENTO *IN SITU* DE REAÇÕES QUÍMICAS 42
4.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BIOLUBRIFICANTE 42
4.9. COMPARAÇÃO DO PES DE *RHIZOMUCOR MIEHEI* COM A LIPASE COMERCIAL LIPOZYME RM-IM 43
4.10. ESTUDO DA REUTILIZAÇÃO DO PES DE *RHIZOMUCOR MIEHEI* E DA LIPASE COMERCIAL LIPOZYME RM-IM NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO 43
4.11. ENSAIO DE BIODEGRADABILIDADE IMEDIATA 44

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO 45

5.1. PRODUÇÃO DO PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO DE *RHIZOMUCOR MIEHEI* EM TORTA DE BABAÇU 45
5.2. ZIMOGRAMA PARA PROSPECÇÃO DE BIOCATALISADORES 45
5.3. SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTE POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE BIODIESEL DE SOJA E NEOPENTILGLICOL UTILIZANDO PES 48
***5.3.1. Preliminar** 48*
***5.3.2 Estudo da influência de variáveis reacionais na produção do biolubrificante por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização do processo** 54*
5.4. PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE POR ENZIMA COMERCIAL RM-IM E PES 67
5.5. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO 72
***5.5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)** 72*
***5.5.2. Físico-química** 75*
5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REUTILIZAÇÃO DO PES 77
***5.6.1 Reutilização do PES em batelada simples ou em batelada alimentada** 77*
***5.6.2. Estabilidade do biocatalisador: estudo da dessorção enzimática após lavagem com solvente** 81*
5.7. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO: REMOÇÃO DE ACIDEZ, APROVEITAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA E REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE CONDIÇÕES DE BATELADA ALIMENTADA 83
5.8. MONITORAMENTO DE REAÇÃO EM TEMPO REAL ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO 89
5.9. BIODEGRADABILIDADE DO BIOLUBRIFICANTE 92
6. CONCLUSÕES 96
7. ETAPAS FUTURAS 98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 99
APÊNDICE A: artigo publicado 111
APÊNDICE B: patente depositada 118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Cadeia de Valor do segmento de lubrificantes. Fonte: BNDES, 2014. 5

Figura 2: Demanda prevista e estimada para lubrificantes no mundo, expressa em milhões de toneladas. Adaptado de: Freedonia, 2013..... 7

Figura 3: Demanda brasileira de lubrificantes expressa em milhões de toneladas. O valor movimentado por este mercado em 2012 foi estimado em 4,5 bilhões de dólares. Adaptado de BNDES, 2014. 10

Figura 4: Importações e exportações do segmento de lubrificantes, separando óleos base, aditivos e lubrificantes acabados. Fonte: BNDES, 2014. 12

Figura 5: Distribuição da coleta de óleo usado e contaminado (OLUC) no Brasil (mil toneladas, 2012). Fonte: Agência Virtual/Sindicato Nacional da Indústria do Rerrefino de Óleos Minerais. (SINDIRREFINO). 13

Figura 6: Volume de Lubrificantes acabados comercializados no Brasil e o PIB brasileiro. Fonte: Anuário 2019 PLURAL-SINDICOM, 2020. 14

Figura 7: Cadeia oleoquímica simplificada. Adaptada de (BAIN & COMPANY, 2014a)**.** 15

Figura 8: Ciclo de vida de um produto químico (*cradle-to-cradle*) em uma economia circular. Extraído de Clark *et al*., ... 16

Figura 9: Principais matérias-primas da oleoquímicas brasileira e sua cadeia de valor. Extraído de BAIN & COMPANY 18

Figura 10: Comparativo de produção, exportação, consumo e estoque final de soja no Brasil nas últimas 10 safras (mil t). Extraído de CONAB 19

Figura 11: Produção Brasileira Anual de Biodiesel. A produção de biodiesel apresenta forte crescimento desde 2007. Até o final de 2019, um total de 5,377 milhões de m^3 de biodiesel haviam sido produzidos. Fonte: (ABIOVE, 2019). 19

Figura 12: Produção Brasileira de Biodiesel por de matéria-prima. A produção de biodiesel de soja gira em torno de 70% da produção anual brasileira desde 2007; em 2019, sua produção correspondeu a 68% de toda produção brasileira, o equivalente a 3,6 milhões de m^3. Fonte: (ABIOVE, 2019). 20

Figura 13: Composição do fruto do babaçu. O epicarpo, mais externo e fibroso, corresponde a 12,6% da massa do coco. O mesocarpo, rico em amido, compõe 20,4%. As amêndoas constituem 8,7% da massa total do coco e delas é obtido o óleo de babaçu. O endocarpo corresponde a 58,4% do fruto. 22

Figura 14: Um grupo de mulheres quebradeiras cooperativadas (à esquerda) reunidas para a quebra do coco babaçu (em detalhe, à direita). Fonte: http://www.tobasa.com.br. 22

Figura 15: Estrutura esquemática dos triglicerídeos, mostrando posições vulneráveis à degradação química. Extraído de (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2012a). 26

Figura 16: Poliois: Neopentilglicol (NPG), trimetilolpropano (TMP) e Pentaeritritol (PE). FONTE: (HE et al., 2004). 27

Figura 17: Ésteres de neopentilglicol (NPG), de Trimetilolpropano (TMP) e Pentaeritritol (PE). FONTE: (HE et al., 2004).....28

Figura 18: Estrutura tridimensional da lipase de *R. miehei* em sua forma fechada (A) e aberta (B) obtida do Protein Data Bank (PDB) em formato WebGL (NGL) em 16/11/2017. As cores salientam as diferentes estruturas secundárias.....29

Figura 19: Fotografia dos reatores de bancada durante reações de transesterificação com a lipase comercial ou o PES de *R. miehei* como catalisador. 37

Figura 20: Fotografias dos reatores de bancada durante reações de transesterificação com o PES de *R. miehei* como catalisador. Em A, o meio reacional e o PES estão sob agitação, mantendo-os homogeneamente distribuídos. Em B, o PES foi decantado durante duas horas, quando então o meio reacional sobrenadante é removido.....44

Figura 21: Gel de SDS-PAGE e zimograma para a reação de transesterificação entre o biodiesel de soja e o NPG. PPM: Marcador de Massa Molecular; RML: lipase comercial solúvel de *R. miehei* (SIGMA, L4277)); PES2: PES de *R. miehei* cultivado em torta de babaçu. T: gel submetido à reação de transesterificação, contendo 10μg/raia de proteínas totais do extrato bruto do PES de *R. miehei* cultivado em torta de babaçu, em duplicata, mostrando atividade na altura da banda observada no gel corado (retângulo azul).....47

Figura 22: Comparação entre o Percentual de Síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de soja e NPG a 40 °C e a 50 °C catalisada pelo PES de torta de babaçu, e tabela ilustrativa resultante da ANOVA. As reações foram conduzidas com razão molar biodiesel/NPG de 3,75:1, concentração de PES 20% (m/m dos substratos), concentração de água 0%, 1 ou 2% (m/m dos substratos), a 40 °C ou 50 °C, em reator de leito agitado, por 48 h. O percentual de acidez já foi descontado dos percentuais de conversão mostrados. Na tabela, destaca-se em vermelho as variáveis ou as interações que apresentaram significância estatística (95% de confiança), detalhadas na tabela 4.....50

Figura 23: Teor de acidez ao longo da reação de síntese de biolubrificante a partir de biodiesel de soja e NPG catalisada pelo PES de torta de babaçu a 40 °C (à esquerda) e à 50 °C (à direita). As reações foram conduzidas com razão molar biodiesel/NPG de 3,75:1, concentração de PES 20% (m/m dos substratos), concentração de água 0%, 1 ou 2% (m/m dos substratos), a 40 °C ou 50 °C, em reator de leito agitado, por 48 h. 52

Figura 24: Comparação entre o Percentual de Síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de mamona e NPG (à esquerda) e biodiesel de soja e NPG (à direita) a 50 °C catalisada pelo PES de torta de babaçu. As reações foram conduzidas com razão molar biodiesel/NPG de 3,75:1, concentração de PES 20% (m/m dos substratos), concentração de água 0%, 1 ou 2% (m/m dos substratos), a 50 °C, em reator de leito agitado, por 48 h. O percentual de acidez já foi descontado dos percentuais de conversão mostrados. 53

Figura 25: Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores na conversão em 8 h de reação entre o biodiesel de soja e o NPG. 57

Figura 26: Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores na conversão em 24 h de reação entre o biodiesel de soja e o NPG. 57

Figura 27: Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores na conversão em 48 h de reação entre o biodiesel de soja e o NPG. 58

Figura 28: Superfície de resposta (a esquerda) e curva de contorno (a direita) para a conversão em 48 h como função da temperatura e do teor de água. A legenda em cores indica a conversão percentual para cada temperatura e teor de água, referentes à razão molar de 3,1:1 (biodiesel:NPG). 63

Figura 29: Representação gráfica das curvas de contorno para os dados de conversão a partir do método de Delineamento Composto Central Rotacional em 48 h. A legenda em cores indica a conversão percentual para cada temperatura e teor de água, referentes à razão molar de 3,1:1 (biodiesel:NPG) à esquerda, e à razão molar de 2:1 (biodiesel:NPG) à direita. 64

Figura 30: Representação gráfica do modelo de ajuste de superfície para os dados de acidez a partir do método de Delineamento Composto Central Rotacional em 48 h. A legenda em cores indica a acidez percentual para cada temperatura e teor de água, referentes à razão molar de melhor conversão (3,1:1). 65

Figura 31: Curso reacional das condições 11 e 15 (ponto central) do DCCR, que apresentaram os melhores resultados de conversão, seguidas de seus respectivos percentuais de acidez. Vermelho – condição 15: razão molar 3,1:1 (BDS:NPG); Azul – condição 11: razão molar 2:1 (BDS:NPG). Ambas continham 2,5% de água e ocorreram a 45 °C por 48 h. 65

Figura 32: Cinética da síntese de biolubrificante catalisada pelo PES a partir de biodiesel de soja e NPG, em razão estequiométrica (2:1) ou com excesso de biodiesel (3,1:1), correlacionando o percentual de conversão de hidroxilas e o teor de acidez nas duas proporções de substrato avaliadas. As reações foram conduzidas por 120 h em batelada simples a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m) e 20% de PES (m/m). 70

Figura 33: Cinética da síntese de biolubrificante catalisada pela lipase comercial Lipozyme RM-IM a partir de biodiesel de soja e NPG, em razão estequiométrica (2:1) ou com excesso de biodiesel (3,1:1), correlacionando o percentual de conversão de hidroxilas e o teor de acidez nas duas proporções de substrato avaliadas. . As reações foram conduzidas por 120 h em batelada simples a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m) e 20% de PES (m/m) 71

Figura 34: Caracterização por RMN do produto obtido após 72h de reação a 45 °C com razão molar estequiométrica (2:1 – BDS:NPG) e 2,5% de água (m/m). Os compostos denominados ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÉSTERES METÍLICOS, DINEOPENTIL ÉSTERES E MONONEOPENTIL ÉSTERES estão representados com cadeias carbônicas derivadas de ácido oleico (18:1) e servem de exemplo para todos os componentes derivados deste e dos outros ácidos graxos que constituem o óleo de soja e seus derivados. 73

Figura 35: Caracterização por RMN do produto obtido após 72 horas de reação a 45 °C com razão molar 3,1:1 (BDS:NPG) e 2,5% de água (m/m). Os compostos denominados ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÉSTERES METÍLICOS, DINEOPENTIL ÉSTERES E MONONEOPENTIL ÉSTERES estão representados com cadeias carbônicas derivadas de ácido oleico (18:1) e servem de exemplo para todos os componentes derivados deste e dos outros ácidos graxos que constituem o óleo de soja e seus derivados. 74

Figura 36: Reutilização da enzima em ciclos de 48 horas de reação seguidos por lavagem com solvente. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20%

de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Em azul, o PES lavado com etanol; em vermelho, o PES lavado com hexano. A enzima RM-IM (em cinza) foi lavada com hexano. 78

Figura 37: Reutilização do PES em ciclos de 72 horas de reação e sem lavagem. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Ao final das reações, o meio reacional era removido após a decantação do PES e novos substratos eram adicionados, seguindo a razão molar inicial (3,1:1 de biodiesel de soja e NPG) em massa equivalente à retirada de produto. 79

Figura 38: SDS-PAGE e Zimografia para atividade do PES e proteínas totais após ciclos sucessivos de reações e lavagens com hexano. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Em seguida, o meio reacional era lavado com hexano para recuperação do PES, e este era seco em dessecador por 24 h. Em seguida, o estrato enzimático líquido deste PES foi submetido à SDS-PAGE ou Zimograma, em meio reacional aquoso contendo α-naftil-acetato (para hidrólise) ou meio reacional não-aquoso contendo biodiesel de soja e NPG (razão molar de 3,75:1). S: marcador de massa molecular; BK: torta de babaçu (controle negativo); N: PES novo; 1st: PES reagido e lavado uma vez; 2nd: PES reagido e lavado duas vezes; 3rd: PES reagido e lavado três vezes. Ambas as atividades hidrolítica e de esterificação foram mantidas qualitativamente similares até a terceira lavagem. 82

Figura 39: Teor de acidez do meio reacional em reações conduzidas em batelada simples ou alimentada com etanol. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Após 72 horas de reação houve adição de etanol, e a reação foi mantida até completar 144 horas. A curva em azul mostra o teor de acidez da reação onde foi adicionado o etanol em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica. 84

Figura 40: Teor de acidez do meio reacional em reações conduzidas em batelada simples ou alimentada com NPG. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Após 72 horas de reação houve adição de etanol, e a reação foi mantida até completar 144 horas. A curva em azul mostra o teor de acidez da reação onde foi adicionado o etanol em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica. 85

Figura 41: Teor de ésteres metílicos do biodiesel de soja em reações conduzidas em batelada simples ou alimentada com NPG. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Após 72 horas de reação houve adição de etanol, e a reação foi mantida até completar 144 horas. A curva em azul mostra o teor de acidez da reação onde foi adicionado o etanol em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica. A curva em azul mostra o teor de ésteres metílicos da reação onde foi adicionado NPG em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica.85

Figura 42: Reúso do biocatalisador produzido a partir da fermentação por *R. miehei* da torta de babaçu por lavagem com hexano (verde médio) ou decantação do PES (verde claro), ambos mostrados nas figuras 32 e 34, e a reutilização por decantação do PES na batelada alimentada com NPG (verde escuro). Na batelada alimentada foi adicionado NPG suficiente para atingir a razão equimolar uma vez após 72 horas de reação, e a mesma foi finalizada após 144 horas. As outras reações foram interrompidas após 72 horas, e o PES foi lavado com hexano ou decantado conforme determinado. Todas as reações foram conduzidas a

45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG).....86

Figura 43: Caracterização por RMN do biolubrificante obtido a partir da transesterificação entre o biodiesel metílico de soja e o neopentilglicol (NPG), em razão molar de 3,1:1, realizada em batelada alimentada com NPG uma vez após 72 horas de reação, e finalizada após 144 horas. Uma quantidade inferior a 0,1% de metanol foi detectada pela metodologia; não foi detectada a presença de água. Os compostos denominados ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÉSTERES METÍLICOS, DINEOPENTIL ÉSTERES E MONONEOPENTIL ÉSTERES estão representados com cadeias carbônicas derivadas de ácido oleico (18:1) e servem de exemplo para todos os componentes derivados deste e dos outros ácidos graxos que constituem o óleo de soja e seus derivados.....88

Figura 44: Espectro de infravermelho do biolubrificante obtido a partir de biodiesel de soja e NPG, em razão molar de 3,1:1 e contendo 2,5% de água (m/m), catalisado pelo PES de *R. miehei*, por 72 h a 45 °C. Também são mostrados os espectros do biodiesel de soja e do meio reacional (biodiesel de soja + NPG) antes da adição do PES.....91

Figura 45: Comparação entre a biodegradabilidade primária e a final (ou imediata). Traduzido e adaptado de (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2012b) 93

Figura 46: Porcentagem de CO_2 liberado na solução de benzoato de sódio (marcador triangular), na solução contendo a substância biolubrificante (marcador quadrado) e na solução de teste de inibição (mistura de benzoato de sódio e biolubrificante, indicada pela curva com marcador circular) em função do período de incubação em dias. 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos do óleo de soja. 24

Tabela 2: Viscosidade, índice de viscosidade e pontos de fluidez de óleos selecionados e fluídos hidráulicos idênticos à base de óleo de soja e óleo mineral. 24

Tabela 3: Variáveis e níveis do Planejamento experimental do tipo DCCR para otimização da produção de biolubrificante. 41

Tabela 4: ANOVA resultante da comparação do percentual de conversão a 40 °C e a 50 °C com diferentes teores de água. Em vermelho, observa-se as variáveis ou interações entre variáveis cuja variância resultante teve significância estatística (para 95% de confiança). 51

Tabela 5: Resultados obtidos com as reações para o DCCR com seus respectivos resultados de conversão de hidroxilas e de acidez. 56

Tabela 6: Efeitos das variáveis independentes lineares (L) e quadráticas (Q) sobre a conversão nos diferentes tempos de reação (8 h). Estão destacadas em cinza as variáveis com efeitos considerados estatisticamente significativos ($p<0,05$). 58

Tabela 7: Efeitos das variáveis independentes lineares (L) e quadráticas (Q) sobre a conversão nos diferentes tempos de reação (8 h, 24 h e 48 h). Estão destacadas em cinza as variáveis com efeitos considerados estatisticamente significativos ($p<0,05$). 59

Tabela 8: Efeitos do DCCR para a resposta conversão nos diferentes tempos de reação (8 h, 24 h e 48 h) por ANOVA. Valor de F = média quadrática da regressão/média quadrática do resíduo. 60

Tabela 9: Caracterização físico-química do biolubrificante obtido a partir da reação entre biodiesel de soja e neopentilglicol por 48 horas, com 85,5% de hidroxilas convertidas. 75

Tabela 10: Caracterização físico-química do biodiesel de soja utilizado como matéria-prima para a obtenção do biolubrificante 76

Tabela 11: Comparação entre as composições obtidas por RMN apresentadas nas Figuras 34, 35 e 43, em síntese por batelada simples e por batelada alimentada com NPG. 87

Tabela 12: Porcentagem de CO_2 liberado na solução de benzoato de sódio, na solução da contendo o biolubrificante e na solução de inibição em função do período de incubação de dias. 93

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variâncias
API	American Petroleum Institute
ASTM	American Society for Testing and Materials
BDS	Biodiesel Metílico de Soja
CENPES	Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DIP	Neopentilglicol (o mesmo que NPG)
FES	Fermentação em Estado Sólido (o mesmo que FMS)
FMS	Fermentação em Meio Sólido (o mesmo que FES)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
IAT	Índice de acidez total
IV	Índice de Viscosidade
NPG	Neopentilglicol (o mesmo que DIP)
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PES	Preparado Enzimático Sólido
PET	Pentaeritritol
RML	Lipase de *Rhizomucor miehei*
RMN	Ressonância magnética nuclear
RPVOT	Rotary Pressure Vessel Oxidation Test
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis
TMP	Trimetilolpropano

1. INTRODUÇÃO

Os oleoquímicos compreendem uma classe da indústria química que engloba óleos e gorduras de origem animal e vegetal. Estes são classificados (pelo departamento de Agricultura), de acordo com sua origem, como óleos vegetais comestíveis, óleos industriais, gordura animal e óleos de origem marinha. Estas matérias-primas são usadas na produção de oleoquímicos de base (ácidos graxos, álcoois graxos, glicerina e ésteres), a partir dos quais podem ser produzidas substâncias com ampla variedade de aplicações, como cosméticos, detergentes e lubrificantes.

Um lubrificante é uma substância usada para melhorar o movimento entre as superfícies (LANSDOWN; LEE, 2010). Os lubrificantes são usados para reduzir o atrito, limpar e evitar superaquecimento e corrosão de superfícies sólidas em movimento. A função lubrificante é caracterizada por parâmetros como a viscosidade, a acidez, a corrosividade e a fluidez, refletindo no desempenho dos lubrificantes quanto à habilidade de reduzir o atrito, de resistir à oxidação, de minimizar a formação de depósitos e de impedir a corrosão e o desgaste (PROFITO et al., 2013). Estas características dependem do tipo de matéria-prima empregada, da natureza da catálise empregada em sua síntese, das concentrações utilizadas no processo e do tempo e das condições de condução das reações, criando-se assim uma gama de substâncias de potencial lubrificante a serem estudadas e desenvolvidas.

O último relatório encomendado pelo Brasil ao BNDES, publicado em 2014, desenha o cenário favorável para a oleoquímica brasileira, apontando a disponibilidade e variedade de matérias-primas oleaginosas, o domínio da tecnologia empregada na lavoura, além da extensão territorial, das condições clima favoráveis e demanda interna de produtos especializados (BAIN & COMPANY, 2014a). Contudo, os principais desafios listados são a ausência de legislação regulatória que incentive a produção de oleoquímicos e a ausência de rotas tecnológicas viáveis e de custo competitivo. Bart e colaboradores (2013a), por outro lado, citam que, para a produção de biolubrificantes, as dificuldades comumente encontradas são o alto custo das rotas existentes e a disponibilidade limitada de matéria-prima. Logo, estas ponderações apontam para a importância do desenvolvimento de rotas tecnológicas que se utilizem das matérias-primas brasileiras, que possuam custos atraentes e que atendam às peculiaridades do mercado interno. Esta é a grande motivação para o desenvolvimento desta tese, uma vez que a pesquisa científica nacional é o principal meio estratégico para o desenvolvimento tecnológico do país.

Os lubrificantes, de uma forma geral, devem apresentar certas propriedades físico-químicas dentro de determinadas especificações, como por exemplo: viscosidade, índice de acidez, corrosividade, ponto de fluidez, etc. No caso dos biolubrificantes, geralmente constituídos por ésteres orgânicos, as estabilidades oxidativa, térmica e hidrolítica são essenciais, sendo a primeira uma das propriedades mais importantes no desenvolvimento de um lubrificante biodegradável. Entretanto, à medida que se sintetiza uma molécula mais resistente à oxidação, deve-se levar em consideração que a ação dos micro-organismos responsáveis pela sua biodegradação também será dificultada. Assim, um dos grandes desafios reside no fato de se tentar encontrar um equilíbrio, ou seja, uma molécula que tenha alta resistência à oxidação e seja biodegradável (GRYGLEWICZ; PIECHOCKI; GRYGLEWICZ, 2003).

Os ésteres sintéticos são a principal forma de biolubrificante utilizada no mundo (LUZURIAGA; MARIONI, 2018). Diferentes vias de síntese enzimática vêm sendo estudadas, empregando enzimas fúngicas comerciais sólidas (FERNANDES et al., 2020; HO; MCAULEY; PEPPLEY, 2019; WATANABE et al., 2007) ou líquidas (ADACHI et al., 2013; ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017).

Nesta tese, a partir de ésteres metílicos de biodiesel de soja, foi possível produzir um óleo base biolubrificante utilizando transesterificação enzimática. Esta via de síntese é catalisada essencialmente por lipases, e permanece custosa devido ao alto custo destes biocatalisadores. Para esse problema, empregou-se um biocatalisador não comercial, rico em lipases do fungo *Rhizomucor miehei*, produzido através de Fermentação no Estado Sólido (FES). Esta modalidade de fermentação, ao contrário da fermentação submersa (FS), permite reduzir drasticamente o custo produtivo, uma vez que podem ser empregados coprodutos industriais como meio de cultivo, tal qual a torta de babaçu empregada na FES utilizada neste trabalho, em vez de meios líquidos estéreis, comerciais e definidos, mais custosos (AMORIM et al., 2017; GODOY et al., 2011b).

Este biocatalisador chamado Preparado Enzimático Sólido (PES) foi primeiramente investigado por Silva (SILVA, 2014), que desenvolveu a metodologia para o cultivo favorável à síntese de lipases. Em seguida, foi aplicado por Aguieiras na produção de ésteres a partir de óleo ácido de macaúba (AGUIEIRAS, 2015), e mostrou-se reutilizável por uma dezena de vezes, desde que recuperado com solvente orgânico. Este último trabalho originou uma análise econômica publicada no mesmo ano que estimou um custo de 560 dólares para cada tonelada deste PES (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015) o que, comparado ao custo de U$ 847/Kg (JIN et al., 2013) da sua equivalente comercial, a Lipozyme RM-IM,

corrobora o potencial do cultivo de cepas produtoras de lipídeos por FES como uma estratégia de produção de lipases de menor custo. Estas, para a oleoquímica de combustíveis e lubrificantes, apresentam outras duas vantagens: já estão naturalmente mais concentrados do que as enzimas produzidas por FS e não carecem de etapas de purificação (OLIVEIRA et al., 2018).

Para escolher as matérias-primas para a produção de biolubrificante, comumente se realizam ensaios preliminares com reatores de bancada. Ainda que sejam necessárias etapas posteriores de escalonamento para aumento de volume, estes reatores são o meio mais confiável para estudar reações de síntese de ésteres. Entretanto, a execução de uma infinidade de reações para determinar a escolha de uma combinação de substratos e de enzima pode ser mais trabalhosa e cara. Por essa razão, investiu-se também no desenvolvimento de uma metodologia para prospecção de lipases para reações de esterificação e/ou transesterificação por meio de Zimografia, tornando a seleção mais rápida do ponto de vista qualitativo, e reduzindo a quantidade de matéria-prima necessária para as investigações iniciais.

Os objetivos desta tese serão apresentados na próxima seção. Em seguida, um capítulo e seus subitens trarão uma revisão bibliográfica sobre lubrificantes, lipases e demais pontos primordiais para contextualizar este trabalho. Em sucessão a esta revisão serão apresentados e discutidos os resultados obtidos e as conclusões, e também uma seção de recomendações para trabalhos futuros. Por fim, são colocados o trabalho publicado e a patente gerada.

2. OBJETIVOS

Considerando o custo dos biocatalisadores como um fator limitante do amplo uso de lipases na síntese de biolubrificantes, esta tese visa o desenvolvimento de um bioprocesso para produção de biolubrificante a partir da transesterificação enzimática, que será catalisada por lipases obtidas por FES da cepa de *Rhizomucor miehei* cultivada em resíduos agroindustriais de babaçu. Os objetivos específicos são:

- Desenvolver uma metodologia de prospecção de catalisadores para síntese de biolubrificantes;

- Aplicar o preparado enzimático sólido (PES) obtido através do cultivo por fermentação em meio sólido (FMS) de cepa fúngica de *Rhizomucor miehei* na síntese de biolubrificantes;

- Compreender a relevância de fatores reacionais, como o teor de água, a razão molar entre os substratos e a temperatura na transesterificação enzimática a partir de biodiesel de soja e do poliálcool neopentilglicol (NPG), afim de desenvolver uma rota de síntese de biolubrificante;

- Caracterizar o biolubrificante obtido, em relação aos parâmetros de viscosidade, fluidez e estabilidade térmica;

- Avaliar o potencial de reutilização do PES de *R. miehei* em reatores do tipo batelada;

- Comparar os resultados obtidos nas reações de transesterificação utilizando o PES de *R. miehei* como biocatalisador com os obtidos utilizando a lipase comercial de *R. miehei* Lipozyme RM-IM;

- Investigar o potencial de biodegradabilidade do produto obtido;

- Avaliar o potencial de acompanhamento da síntese de biolubrificante por transesterificação enzimática, usando espectroscopia de infravermelho.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. LUBRIFICANTES: DEFINIÇÃO E DEMANDA

O termo lubrificante é utilizado para nomear substâncias que apresentam propriedades relativas a esta finalidade, sendo também empregado como referência aos produtos lubrificantes acabados, quando do ponto de vista mercadológico. Neste contexto, a cadeia de valor dos lubrificantes pode ser dividida em quatro elos, que são representados na Figura 1. A cadeia se inicia com os óleos base, também chamados de óleos básicos, principal matéria-prima para a produção dos diversos tipos de lubrificantes. Os óleos base são combinadas com aditivos que conferem propriedades físicas e/ou químicas especiais aos lubrificantes.

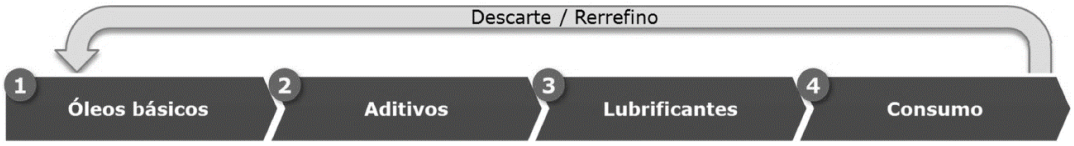


Figura 1: Cadeia de Valor do segmento de lubrificantes. Fonte: BNDES, 2014.

Os óleos base compõem o primeiro elo da cadeia e podem ter diversas origens: renováveis, de origem animal ou vegetal, procedentes da oleoquímica; óleos minerais, derivados de petróleo, procedentes da cadeia de refino; óleos sintéticos, produzidos a partir de óleos industrialmente sintetizados provenientes da cadeia petroquímica; óleos compostos: constituídos pela mistura de dois ou mais tipos; óleo usado ou contaminado (OLUC), constituído de óleo reciclado por meio de um processo de rerrefino. O rerrefino compreende a remoção de contaminantes, de produtos de degradação e de aditivos dos OLUCs, conferindo-os características de óleos base que atendam às especificações em vigor na Agência Nacional do Petróleo (ANP). Os óleos base são usualmente classificados em cinco grupos, denominados Grupos API, de acordo com o American Petroleum Institute (API). A classificação nestes grupos é ditada pela qualidade e pela composição química dos óleos base. Os cinco grupos são: grupo I, que abrange os óleos base provenientes da destilação fracionada do petróleo na refinaria seguida de um processo de extração por solvente, destinado a melhorar propriedades como a estabilidade à oxidação e para remoção de ceras; grupo II, constituído de óleos base provenientes da destilação fracionada do petróleo, seguida de um processo de hidrotratamento (hidrogenação e remoção de impurezas); Grupo III, formado por óleos base do Grupo II

submetidos a um processo adicional de hidro tratamento, visando obtenção de melhores índices de viscosidade; grupo IV, que inclui óleos compostos por polialfaolefinas (PAO) obtidas normalmente pela trimerização catalítica do deceno-1; e grupo V, que abarca todos os demais óleos base não inclusos nos grupos de I a IV. São exemplos deste grupo os óleos naftênicos e os ésteres. Os óleos dos grupos I e II são conhecidos como minerais e os óleos dos grupos IV e V como sintéticos. Os óleos do Grupo III são designados como sintéticos na maioria dos países, mas como minerais em outros por derivarem do refino do petróleo. No Estudo, os óleos do grupo III são tratados como minerais.

A qualidade do óleo base determina a qualidade final do lubrificante. Óleos base do Grupo IV normalmente geram os lubrificantes de melhor qualidade, seguidos, respectivamente, dos Grupos III, II e I. O Grupo V, de forma geral, possui qualidade superior. Apesar disso, o uso de aditivos pode conferir propriedades semelhantes a lubrificantes de diferentes bases.

Os aditivos são compostos químicos que, quando adicionados aos óleos base, reforçam algumas qualidades ou eliminam propriedades indesejáveis destes. Eles podem apresentar natureza detergente, dispersante, antioxidante e outras.

A formulação dos lubrificantes gera um produto acabado que consiste, em volume, em aproximadamente 10% de aditivos e 90% de óleos base (RUDNICK, 2013). Os lubrificantes possuem uma ampla gama de classificações segundo sua qualidade e suas propriedades, sendo uma delas a classificação API.

Por fim, o lubrificante é utilizado em diversas aplicações. O setor automotivo, por exemplo, o maior consumidor de lubrificantes, foi responsável por 60% do consumo total de lubrificantes no Brasil em 2012 (SINDICOM, 2013). Em seguida vem o setor industrial, que representou 30% do mercado brasileiro de lubrificantes no mesmo ano. Os demais setores como o naval, ferroviário e aéreo somaram os 10% restantes.

3.2. DEMANDA GLOBAL DE LUBRIFICANTES

No mercado mundial, a demanda global de lubrificantes foi de 39,2 milhões de toneladas em 2012 e cresceu a uma taxa aproximada de 1,0% ao ano entre 2007 e 2012 como mostra a Figura 2. Para o período de 2012 a 2017 previa-se um crescimento de 2%, decorrente do reaquecimento de economias da América do Norte e da Europa, atingindo a marca dos 43,9 milhões de toneladas.

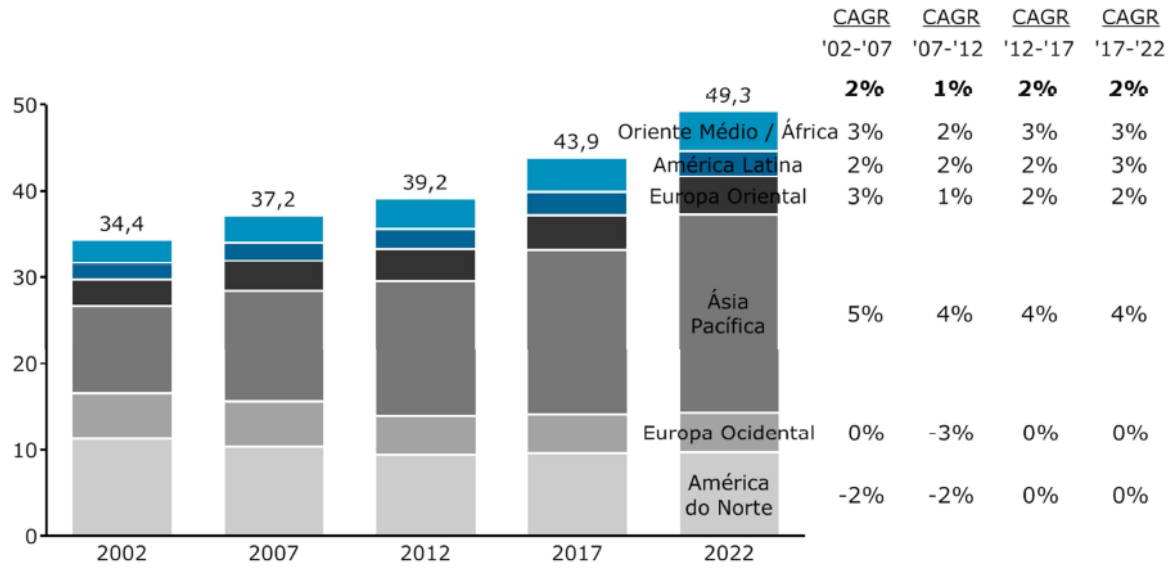


Figura 2: Demanda prevista e estimada para lubrificantes no mundo, expressa em milhões de toneladas. Adaptado de: Freedonia, 2013.

Um dado relevante a ser pontuado é a discrepância entre a projeção de crescimento do PIB mundial para o período de 2012 a 2017 (3,9%) (SINDICOM, 2016) e o crescimento da demanda global por lubrificantes para o mesmo período (2,3%). Dentre os motivos para explicar a menor demanda dos lubrificantes destacam-se o aumento da eficácia destas substâncias, que proporciona maiores intervalos entre trocas e reposições, e a utilização de motores mais eficientes e cada vez menores, que requerem quantidades inferiores de lubrificantes (LANSDOWN, 2003).

Há outras duas tendências relevantes no mercado de lubrificantes que vêm caminhando juntas: o aumento da demanda por lubrificantes obtidos a partir de fontes renováveis e a maior exigência do mercado por lubrificantes de maior qualidade. De acordo com o último relatório sobre oleoquímicos financiado pelo BNDES, os produtos do segmento de biolubrificantes já representam aproximadamente 1% da demanda global de lubrificantes, com a perspectiva de

que o segmento cresça para 3% até 2017 (BAIN & COMPANY, 2014b). O relatório de oleoquímica brasileira aponta como principais fatores de suporte desta tendência a política ambiental europeia EN13432, que normatizou e estabeleceu exigências para o descarte de lubrificantes, além da adoção de lubrificantes de grau alimentício em maquinários da indústria alimentícia e da utilização de lubrificantes biodegradáveis em transformadores (BAIN & COMPANY, 2014a). Neste contexto, os biolubrificantes reduzem os custos de descarte e contaminação, tornando o produto mais competitivo. O segundo fator apontado é a tendência por lubrificantes de maior qualidade, como resultado, principalmente, do desenvolvimento tecnológico. Os novos equipamentos apresentam maior variedade de tecnologias, especificidades, funcionamento sofisticado. Desse modo, sua máxima eficiência e desempenho demandam lubrificantes de maior qualidade, com especificações antes não vistas, para atender condições de operação que exigem maior proteção à fatores como o desgaste excessivo dos componentes e o superaquecimento.

O Brasil ainda não possui uma regulamentação específica para lubrificantes de grau alimentício nem exigências quanto aos lubrificantes permitidos em transformadores. Por sua vez, os óleos vegetais para transformadores de potência já estão ganhando mercado no exterior. Em 2012, aproximadamente 20% dos óleos utilizados em transformadores nos Estados Unidos foram óleos vegetais, enquanto no Brasil os óleos vegetais corresponderam a apenas 3% do total de óleo utilizado para este fim (BAIN & COMPANY, 2014b). Esta tendência de aumento da utilização de óleos vegetais em transformadores decorre, dentre outros fatos, do alto custo para remediação de áreas onde ocorre vazamento de óleo mineral dos transformadores.

Como a maior parte do lubrificante acabado é composta por óleos base, o mercado destes óleos é diretamente influenciado pelas tendências observadas no mercado de lubrificantes. A produção de lubrificantes de maior qualidade requer a utilização de óleos base também de melhor qualidade. Isto parece coerente ao se analisar pesquisas recentes de mercado que preveem uma mudança no padrão de consumo dos diferentes grupos API de óleos base de origem mineral. As estimativas apontam que os óleos do grupo I terão queda de participação no mercado de 53% em 2012 para estimados 30% em 2018, enquanto a fatia dos grupos II e III aumentará de 37% em 2012 para 59% em 2018 (SINDICOM, 2016). A participação de óleos dos Grupos IV e V, incluindo os biolubrificantes, deve passar de 10% em 2012 para 11% em 2018. Apesar de possuírem maior qualidade e de haver uma tendência anteriormente citada de aumento no consumo de biolubrificantes, o elevado custo dos óleos sintéticos em comparação com os minerais impede um crescimento mais acelerado.

Os lubrificantes são, em geral, produzidos por indústrias que já atuam no segmento de combustíveis ou outros segmentos, e não por empresas exclusivas do setor. Isso faz com que o segmento de lubrificantes não seja o carro-chefe destas empresas, e justifica a dificuldade no acesso aos dados de rentabilidade do setor (BAIN & COMPANY, 2014b). Além disso, as empresas produtoras de aditivos para lubrificantes possuem capital fechado e não disponibilizam suas informações financeiras ao mercado. Estima-se que o segmento de aditivos consiga a margem mais rentável de lucro, por frequentemente deterem tecnologias mais avançadas do que as despendidas no desenvolvimento da maior parcela dos óleos base.

Já as previsões globais para o quinquênio seguinte apontaram a continuação do crescimento a taxas ainda maiores. O mercado global de biolubrificantes ter sido superficialmente estimado em 36,9 milhões de toneladas em 2016, constituindo ainda cerca de 1% do total do mercado de lubrificantes (LUZURIAGA; MARIONI, 2018), estudos realizados em 2017 estimaram que o mercado mundial de biolubrificantes cresceria a uma taxa composta de 6,4% entre 2018 e 2023 (GRAND VIEW RESEARCH, 2018). Neste último ano, o segmento, que movimentou 2,74 bilhões de dólares em 2018, movimentaria em torno de 3,36 bilhões de dólares (MARKETS AND MARKETS, 2018).

Alguns fatores influenciam esta projeção. As preocupações ambientais com relação aos efeitos prejudiciais dos lubrificantes à base de minerais são cada vez mais altas em mercados desenvolvidos: em 2020, mais de 80% da demanda por biolubrificantes é derivada dessas regiões (MARKETS AND MARKETS, 2018). A expectativa de aumento nas restrições ambientais de diversos países, em especial EUA, Alemanha, França, Suíça e Áustria, se esmera nas periódicas movimentações também para o incentivo deste mercado. Regulamentações específicas, como a Vessel General Permit (VGP), que regulamenta os descartes acidentais de navios, foi emitida em 2013 pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos da América (U.S. EPA), que declarou em 2018 que a renovaria em 2019 (BLANK ROME LLC, 2018). Novamente nos EUA, um projeto de lei n° 916 do Senado Estadunidense, apresentado pelo senador do estado da Califórnia, determinou que os usuários finais de carros de passeio e veículos leves consumissem óleos de motor com 25% de conteúdo biodegradável a partir de janeiro de 2017 (MARKETS AND MARKETS, 2018). Isso foi projetado para impulsionar a demanda de biolubrificantes no setor de automóveis de consumo. Na Europa, por sua vez, os rótulos ecológicos (chamados de ecolabels) emitidos às empresas a partir de certificação pela União Europeia desde 1992 estão se popularizando e impulsionando o mercado (EUROPEAN COMISSION, 2019).

3.3. MERCADO BRASILEIRO

Conforme indicado na Figura 3, o mercado brasileiro de lubrificantes foi de 1,26 milhões de toneladas em 2012, segundo Sindicom (SINDICOM, 2013) (o mesmo mercado é estimado em 1,24 milhões de toneladas pela Freedonia, fonte do histórico e das projeções de crescimento utilizadas na Figura 2). Estima-se que esse mercado, avaliado sob o aspecto do crescimento dos volumes físicos, da demanda por lubrificantes de maior qualidade e da regulamentação, tenha atingido um valor de 4,5 bilhões de dólares no mesmo ano (COSAN, 2013).

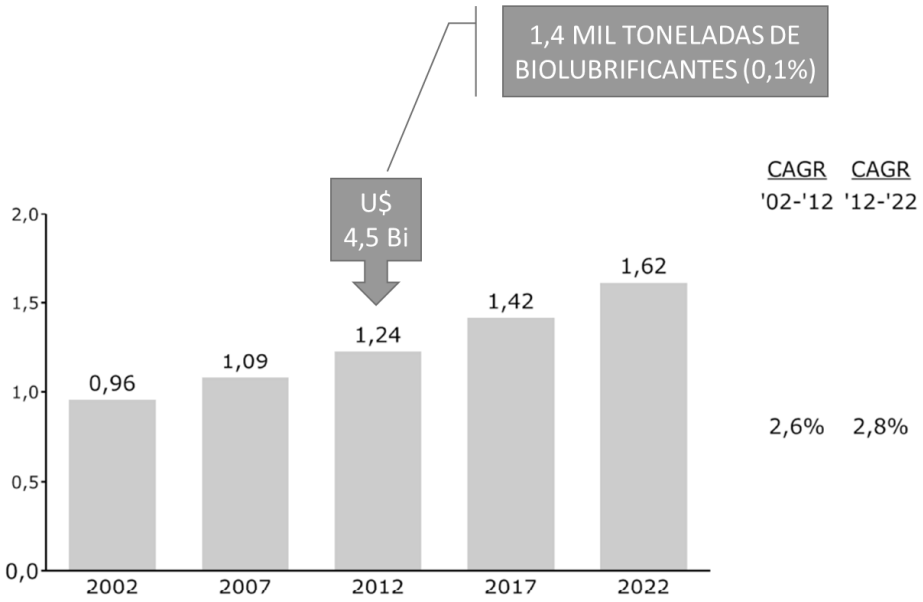


Figura 3: Demanda brasileira de lubrificantes expressa em milhões de toneladas. O valor movimentado por este mercado em 2012 foi estimado em 4,5 bilhões de dólares. Adaptado de BNDES, 2014.

O mercado brasileiro de lubrificantes tem projeção positiva de crescimento: apresentou uma taxa média de crescimento de 2,6% ao ano entre 2002 e 2012 (Figura 3), e projeta-se um crescimento de 2,8% ao ano para o período de 2012 a 2022. Dentre os fatores que influenciam este crescimento destacam-se a expansão do mercado automotivo nacional e o crescimento da indústria brasileira, apresentando um contrabalanceando o volume de lubrificantes consumidos e tendência de redução do mesmo volume pelo uso de motores mais modernos e pela maior eficiência dos lubrificantes atuais, duas tendências esperadas para o mercado brasileiro. Em comparação com os países desenvolvidos, os lubrificantes consumidos no Brasil tanto no mercado automotivo quanto no industrial possuem qualidade inferior, especialmente devido à defasagem tecnológica dos veículos. Contudo, alguns especialistas do setor apostam em uma evolução no perfil da demanda no médio prazo principalmente no segmento automotivo, conforme tendência global (BAIN & COMPANY, 2014b).

Em 2012, o consumo de biolubrificantes no Brasil foi de 1,4 mil toneladas (SINDICOM, 2013). Este valor representa apenas 0,1% do volume total de lubrificantes do mercado local, enquanto a parcela dos biolubrificantes no mercado global já é de 1%; o desenvolvimento destas e de outras aplicações baseadas em biolubrificantes devem fazer crescer o mercado local de óleos com origem renovável (BAIN & COMPANY, 2014b).

A balança comercial brasileira indica que o crescimento da demanda brasileira por lubrificantes tem se convertido em aumento das importações desse segmento: de 2008 a 2012 houve um crescimento de 30% do volume de importações (Figura 4), levando o déficit do segmento a quase 1 bilhão de dólares em 2012 (com importações de 1.127 milhões de dólares e exportações de 209 milhões de dólares) (BAIN & COMPANY, 2014b). Estes dados apontam para um dado ainda mais crítico: os óleos base foram responsáveis por aproximadamente 60% desse déficit, enquanto os lubrificantes acabados representaram 23% e os aditivos, 17%. Apesar do crescimento da demanda brasileira por lubrificantes, a produção local de óleos base manteve-se constante entre 2010 e 2015.

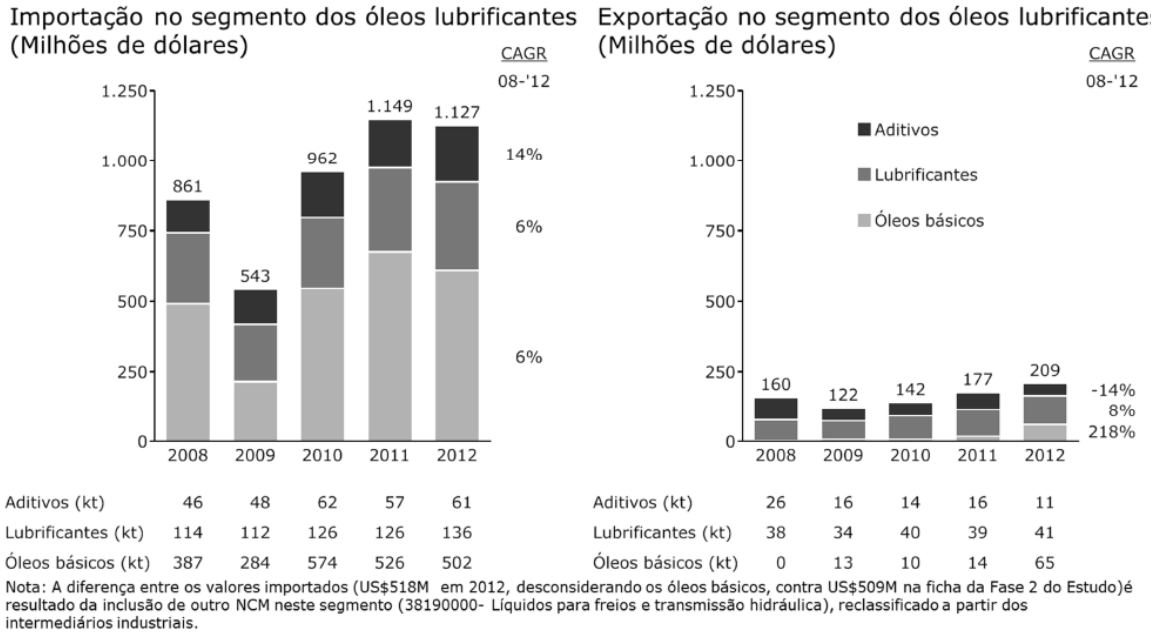


Figura 4: Importações e exportações do segmento de lubrificantes, separando óleos base, aditivos e lubrificantes acabados. Fonte: BNDES, 2014.

As importações líquidas de 437 mil toneladas de óleos base (importações de 502 mil toneladas e exportações de 65 mil toneladas) representaram aproximadamente 36% do consumo local em 2012. O restante do mercado local foi atendido pela produção das refinarias brasileiras (45%) e pelo rerrefino local (19%), como explicitado na Figura 4.

O refino do petróleo e o rerrefino são responsáveis por quase a totalidade da produção global de óleos base. As rotas chamadas de XTL constituem vias que transformam gás (por meio do processo *gas-to-liquids* – GTL), carvão (por meio do *coal-to-liquids* – CTL) ou biomassa (por meio do *biomass-to-liquids* – BTL) em óleos base. As duas primeiras são incipientes no Brasil, e a terceira vem sendo estudada devido a competitividade do Brasil frente a disponibilidade de matéria-prima da agroindústria (CAVALCANTE et al., 2014).

A matéria-prima do rerrefino são os óleos lubrificantes usados ou contaminados (OLUCs), gerados a partir do consumo de lubrificantes. A Resolução 362 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) indica o rerrefino como destino prioritário de todo o óleo usado ou contaminado que tenha sido coletado. A Figura 5 traz estimativas do SINDIRREFINO sobre coleta e refino de óleos usados, bem como sua perda ao ambiente. Apesar de a maior parte dos lubrificantes usados ser coletada, observa-se que quase 2/3 acabam desviados ao ambiente, sendo este o destino de quase 16% do total dos lubrificantes consumidos no Brasil.

Os lubrificantes obtidos por rota renovável (biolubrificantes) ainda são pouco competitivos em custo quando comparados aos lubrificantes obtidos pela rota convencional. Porém, com a expectativa de crescimento da demanda por biolubrificantes, observam-se muitos investimentos direcionados para a rota renovável, além do efeito do ganho de produtividade por meio do aumento da experiência acumulada. Com isso, o custo de produção por esta rota tende a diminuir nos próximos anos.

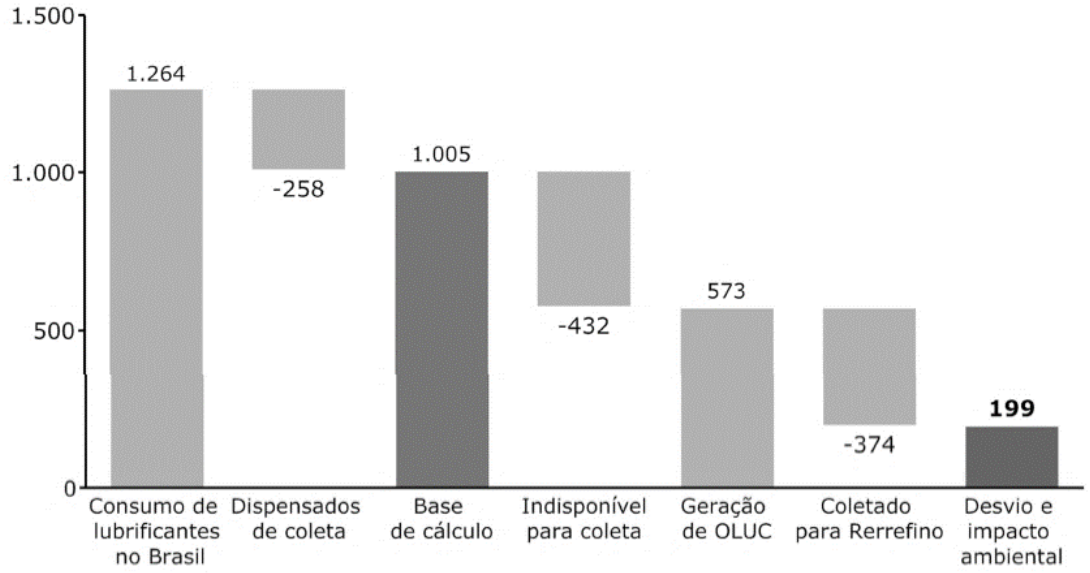


Figura 5: Distribuição da coleta de óleo usado e contaminado (OLUC) no Brasil (mil toneladas, 2012). Fonte: Agência Virtual/Sindicato Nacional da Indústria do Rerrefino de Óleos Minerais. (SINDIRREFINO).

Apesar das previsões, o mercado brasileiro de lubrificantes, que apresentou franco crescimento até 2013 (ano em que foram vendidos 1,447 bilhão de $m^{3)}$, passou por um período de queda, entre 2014 e 2016, tendo esta sido atribuída pelos órgão do setor à crise econômico-política (PLURAL-SINDICOM, 2020). A retomada, contudo, iniciou-se em 2017, e em 2018 registrou recuperação no crescimento pelo segundo ano consecutivo, com 1,29 bilhão de m^3 de lubrificantes acabados foram vendidos no país (Fig. 5). Isso equivale a um aumento de 2,9% comparado ao ano anterior. Em 2019, este volume saltou para 1,32 bilhão de m^3 (ANP, 2020).

Em 2018, registrou recuperação no crescimento pelo segundo ano consecutivo, o equivalente a um aumento de 2,9% comparado ao ano anterior.

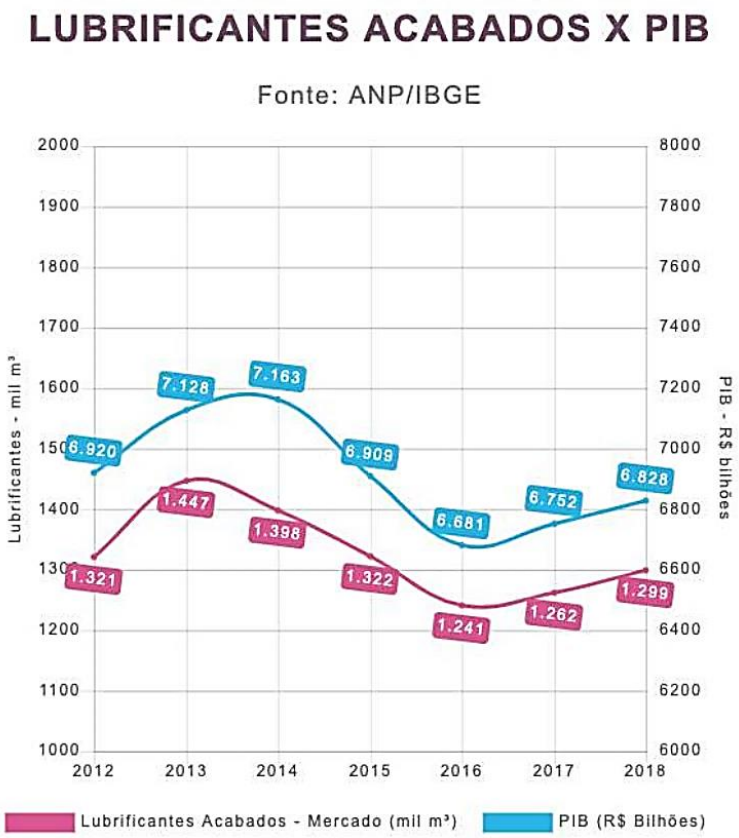


Figura 6: Volume de Lubrificantes acabados comercializados no Brasil e o PIB brasileiro. Fonte: Anuário 2019 PLURAL-SINDICOM, 2020.

3.4. AS BIORREFINARIAS E POLOS OLEOQUÍMICOS COMO ESTRATÉGIA PARA O MERCADO BRASILEIRO

A viabilidade da rota renovável está atrelada ao desenvolvimento das biorrefinarias oleoquímicas e da segurança de suprimento de sua principal matéria-prima básica, as plantas oleaginosas, e de sua matéria-prima direta, os óleos vegetais (VAZ; LAVIOLA; ALVES, 2011). No elo de produção de oleaginosas, o Brasil possui vantagem competitiva em diferentes dimensões: clima favorável, grande extensão de terras cultiváveis, variada disponibilidade de oleaginosas e detenção de tecnologia empregada à lavoura (BAIN & COMPANY, 2014a).

A crescente demanda de combustíveis e do aumento da emissão de gases do efeito estufa estimulam cada vez mais o uso de combustíveis limpos e renováveis, dentre os quais figuram o bioetanol e o biodiesel com uso atual em larga escala no mundo. Um dos principais desafios da cadeia produtiva destes combustíveis é a dependência do preço do produto no mercado, e a introdução do conceito de biorrefinarias nas usinas produtoras de biocombustíveis pode levar a uma redução de custos, aumento do lucro e independência (ALVIM et al., 2014). As

biorrefinarias consistem no sistema de processamento sustentável de biomassa visando a produção conjunta de diversos produtos e coprodutos, desde alimentos, rações, materiais e químicos a e energia (combustíveis, eletricidade, calor) (INTERNATIONAL ENERGY AGENCY, 2011). As biorrefinarias são análogas às refinarias de petróleo, onde múltiplos produtos são obtidos de uma matéria-prima (DEMIRBAS, 2009).

A infraestrutura logística local pode representar um obstáculo, mas este obstáculo pode ser minimizado ao aproximar a produção do óleo e as áreas de cultivo. Esta aproximação tem sido considerada nas tendências do conceito de polo oleoquímico, que se baseia em desenvolver biorrefinarias associadas à disponibilidade de matéria-prima local (KOUTINAS; KOOKOS, 2016). Esta abordagem é vantajosa pois reduz o custo de transporte das matérias-primas até as indústrias. As biorrefinarias de óleo de palmiste do Sudeste são um exemplo do papel crucial que este transporte exerce na economia, conforme indicado no último relatório encomendado pelo BNDES para o desenvolvimento da indústria oleoquímica brasileira (BAIN & COMPANY, 2014a). A matéria-prima vem do Pará, e o custo de seu transporte até o Sudeste supera o custo de importação do mesmo óleo de palmiste proveniente do sudeste asiático. Sob este argumento, a implantação de alguns polos oleoquímicos com alto potencial de desenvolvimento foi sugerida pelo mesmo relatório, sendo um eles um polo oleoquímico de soja, sebo e cana-de-açúcar na região Sudeste. Esta abordagem permite a articulação entre a produção de biocombustíveis e o desenvolvimento de produtos de maior valor agregado, como os lubrificantes. Um esquema simplificado de uma cadeia oleoquímica baseada na soja é visto na Figura 7.

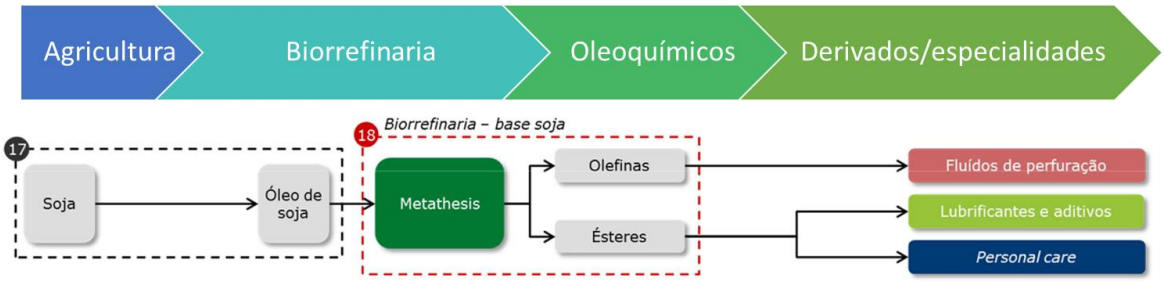


Figura 7: Cadeia oleoquímica simplificada. Adaptada de (BAIN & COMPANY, 2014a)**.**

Apesar de ainda pouco praticado no Brasil, o conceito de economia circular (Figura 8) engloba os polos oleoquímicos e suas biorrefinarias, e o país apresenta vantagens já supracitadas. Uma economia circular busca a indústria química para fornecer a base de produtos inovadores, feitos a partir de matérias-primas renováveis e projetados para serem reutilizados ou reciclados, ou ainda com uma matéria-prima que seja renovada por meio de processos naturais (CLARK et al., 2016). Esta perspectiva viabiliza os produtos da indústria química em um mundo sem desperdício.

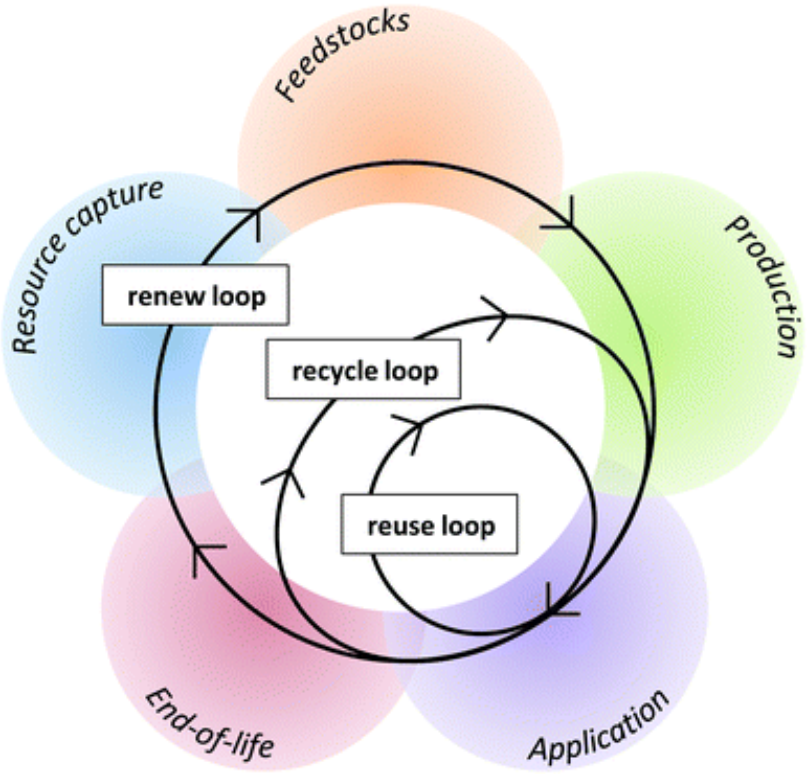


Figura 8: Ciclo de vida de um produto químico (*cradle-to-cradle*) em uma economia circular. Extraído de Clark *et al*., (2016).

3.5. CONTEXTUALIZAÇÃO DAS OLEAGINOSAS NO BRASIL

As oleaginosas são plantas que contém um alto teor de óleo, tanto a partir de suas sementes (soja, canola, girassol) como a partir de seus frutos (palma, babaçu, coco), podendo ser utilizadas para a produção de óleo vegetal. Outra característica importante de algumas dessas plantas é o fato de que após a extração do óleo, os subprodutos podem ser utilizados para diferentes aplicações. No Brasil, com o modelo adotado para o desenvolvimento do Programa Biodiesel, a cadeia de produção desse biocombustível utiliza como principal matéria-prima espécies oleaginosas. A diversidade de culturas agrícolas (oleaginosas) a serem empregadas é grande e varia conforme as características de cada região ou Estado brasileiro. Para cada Estado e região do País, o desenvolvimento das cadeias produtivas das diferentes espécies oleaginosas precisa levar em consideração fatores que envolvem o meio ambiente e suas inter-relações com a sociedade moderna. A EMBRAPA, em 2007, levantou o potencial de cultivo de oleaginosas, mencionando a soja para as regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste, a mamona para o Nordeste e a palma para a região Amazônica (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007). Considerou ainda o girassol, o amendoim e as palmáceas tropicais como viáveis e potenciais produtoras de biodiesel. Ramos et al. (2003) destacaram para a região Norte, por exemplo, a utilização de matérias-primas como a palma, o babaçu e a soja. Na região Nordeste, as oleaginosas com destaque são o babaçu, a soja, a mamona, a palma (dendê), o algodão e o coco. Em relação ao Centro-Oeste, há destaque para a soja, mamona, algodão, girassol e dendê. Para o Sul temos a soja, a canola, o girassol e o algodão. Para a região Sudeste há a soja, a mamona, o algodão e o girassol. Nota-se que a soja possui potencial de cultivo em todas as regiões brasileiras, com destaque para as que tradicionalmente a produzem: a região Centro-Oeste e a região sul.

A soja (*Glycine max*) é uma planta da família das leguminosas. É um pequeno arbusto com altura variando de 40 centímetros a 2 metros de altura, apresenta folhas, ramos e flores avermelhadas. É originária do Sudeste Asiático. No Brasil, sua introdução é remetida ao século XIX no Estado da Bahia.

A soja tem maior fonte de proteínas do que de óleo, porém constitui-se uma importante matéria-prima à indústria alimentícia e química, pois grande parte da produção de óleo brasileira (90%) advém dessa leguminosa (HOLANDA, 2004). Os grãos de soja consistem de 30% de carboidrato, 18% de óleo (85% não saturado), 14% de umidade e 38% de proteína (HOUSTON et al., 2006).

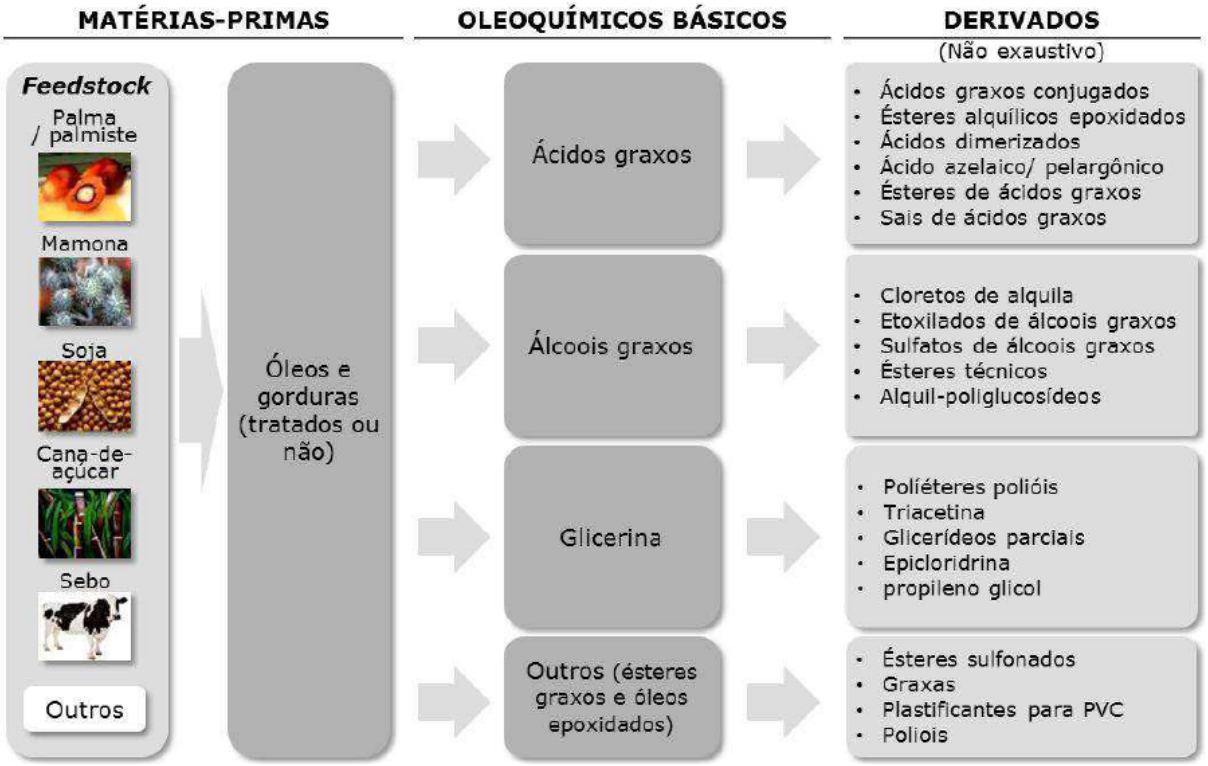


Figura 9: Principais matérias-primas da oleoquímicas brasileira e sua cadeia de valor. Extraído de BAIN & COMPANY (2014b).

Muito utilizado na fabricação de produtos alimentícios, o óleo de soja tem várias outras aplicações, dentre as quais se pode citar: cosmética, farmacêutica, alimentícia, veterinária, nutrição animal, industrial na produção de vernizes, tintas, plásticos, lubrificantes entre outros. Parte destas aplicações é ilustrada na Figura 9, ao lado de outras matérias-primas relevantes para a oleoquímica brasileira.

O Brasil é o segundo maior produtor de soja do mundo, produzindo 103 milhões de toneladas de soja em grãos em 2016, e o quarto maior exportador do mundo, exportando 60 milhões de toneladas anuais (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB, 2017). Na Figura 10, que elenca a produção, exportação, consumo e estoque da Soja no Brasil, observa-se a tendência de crescimento na produção retomada a partir de 2013.

Dentre os derivados da soja está o biodiesel. O biodiesel de Soja (BDS) é um produto produzido com regularidade no Brasil, apresentando franco crescimento desde 2007 (Figura 11) e fechando 2019 com a produção de 5,377 milhões de m^3 de biodiesel (ABIOVE, 2019), impulsionado inicialmente pelo programa de biodiesel brasileiro (FERREIRA; DANIEL; DE LIMA, 2015).

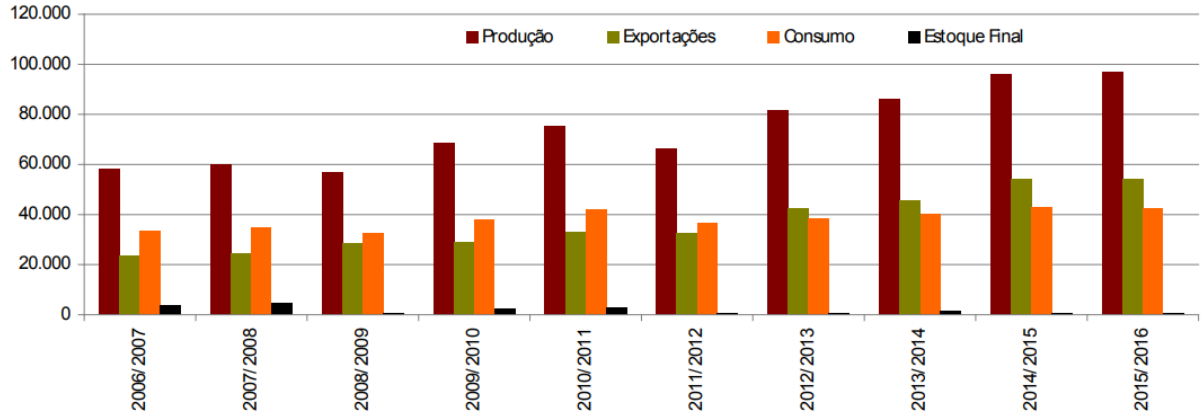


Figura 10: Comparativo de produção, exportação, consumo e estoque final de soja no Brasil nas últimas 10 safras (mil t). Extraído de CONAB (2017).

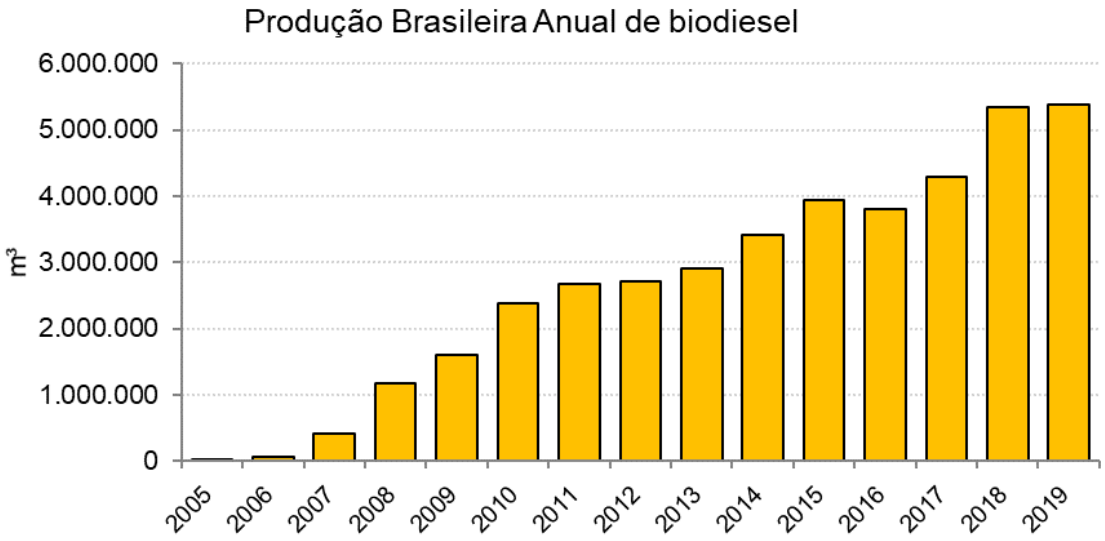


Figura 11: Produção Brasileira Anual de Biodiesel. A produção de biodiesel apresenta forte crescimento desde 2007. Até o final de 2019, um total de 5,377 milhões de m^3 de biodiesel haviam sido produzidos. Fonte: (ABIOVE, 2019).

Desde o início, a produção de biodiesel a partir do óleo de soja correspondeu à maior parte do biodiesel produzido no país. Ao final de 2019, 68% de toda a produção brasileira de biodiesel teve origem na soja, o equivalente a 3,6 milhões de m^3 (Figura 12).

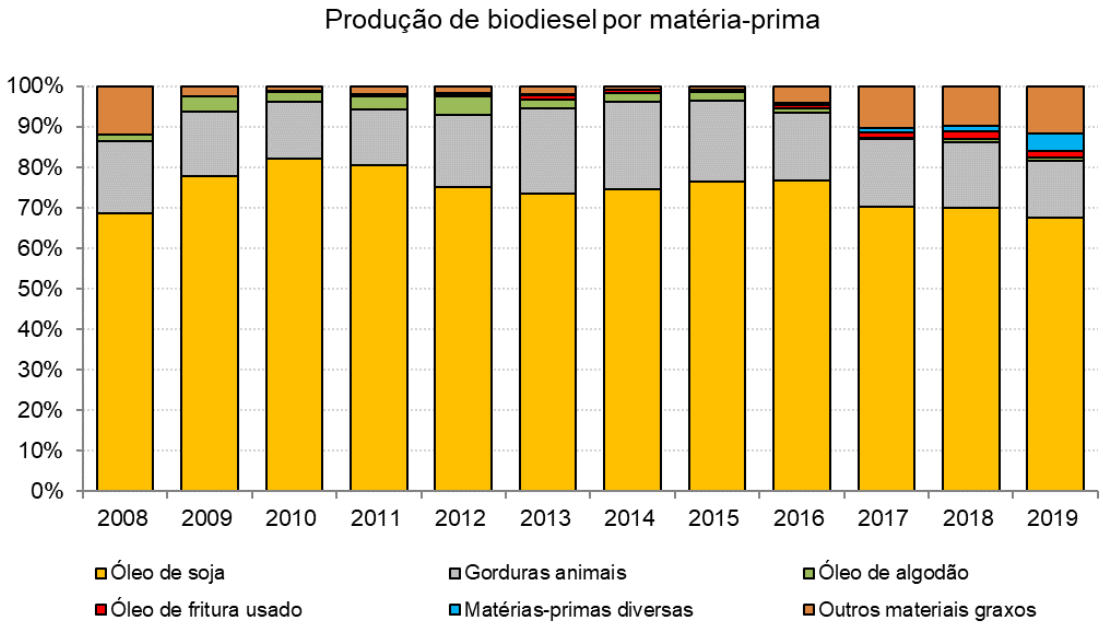


Figura 12: Produção Brasileira de Biodiesel por de matéria-prima. A produção de biodiesel de soja gira em torno de 70% da produção anual brasileira desde 2007; em 2019, sua produção correspondeu a 68% de toda produção brasileira, o equivalente a 3,6 milhões de m^3. Fonte: (ABIOVE, 2019).

Isto ilustra a segurança desta matéria-prima para a produção de biolubrificantes, tanto do ponto de vista da disponibilidade quanto da regularidade. Além disso, o valor agregado de um biolubrificante em relação ao óleo vegetal bruto exportado torna-se um atrativo para sua produção.

3.6. REJEITOS AGROINDUSTRIAIS E O BABAÇU

O babaçu é uma palmeira da família botânica *Arecaceae*, presente em diversos países da América Latina. O babaçu é muito conhecido entre populações tradicionais brasileiras, e dependendo da região, pode ser chamado também de coco-palmeira, coco-de-macaco, coco-pindoba, baguaçu, uauaçu, catolé, andaiá, andajá, pindobassu ou ainda vários outros nomes.

Existem muitas espécies de babaçu, mas as mais conhecidas e que tem o uso mais difundido são *Attalea phalerata* e *Attalea speciosa*. As palmeiras podem medir entre 10 e 30 metros de altura e ter entre 20 e 50 cm de diâmetro de caule; frutificam a partir do oitavo ano e alcançam a produção plena após 15 anos (CARRAZZA; ÁVILA; SILVA, 2012; LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, 2010).

No Brasil, o babaçu é encontrado principalmente em formações conhecidas como babaçuais que cobrem cerca de 196 mil km² no território brasileiro, com ocorrência concentrada nos estados do Maranhão, Tocantins e Piauí, na região conhecida como Mata dos Cocais (transição entre Caatinga, Cerrado e Amazônia). O babaçu também é encontrado nos estados do Ceará, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais. Todas as variedades de babaçu são importantes por seus aspectos ecológicos, sociais, econômicos e ambientais. Por isso, na literatura estes aspectos são quantificados sem distinção entre as variedades de babaçu, considerando todo o gênero *Attalea* (antigo gênero *Orbignya*).

A cadeia produtiva do babaçu é uma das mais representativas do extrativismo vegetal no Brasil, em razão da área de abrangência da palmeira babaçu. Toda a produção de amêndoa de babaçu (Fig. 13) é feita em regime de economia familiar, por meio do trabalho das mulheres quebradeiras de coco babaçu (Fig. 14) e também por crianças, um trabalho árduo em que aproximadamente 300.000 mulheres obtêm fonte de renda principal ou complementar. Nas últimas décadas, a cadeia produtiva do coco babaçu foi fomentada pela sua inclusão no Plano Nacional de Promoção das Cadeias de Produtos da Sócio-biodiversidade (PNPSB), permitindo o aproveitamento integral do babaçu em agroindústrias de base familiar.

O esmagamento das amêndoas do babaçu produz dois tipos de óleos: um para fins comestíveis e outro para fins industriais (óleo láurico). O mercado brasileiro de óleos láuricos constitui-se atualmente no principal mercado para o óleo de babaçu. As indústrias dos segmentos de higiene, limpeza e cosméticos absorvem cerca de 35 mil toneladas anuais de óleo de babaçu bruto e o mercado brasileiro de láuricos (óleos, ácidos e gorduras) está estimado em 80.000 toneladas (CARRAZZA; ÁVILA; SILVA, 2012). Após a extração das amêndoas, o coco pode ser usado para a produção de carvão doméstico ou de empresas siderúrgicas. Contudo, o endocarpo, o pericarpo e o mesocarpo (Fig. 13) do coco do babaçu também são utilizados na indústria, na alimentação animal e na produção de fertilizantes. Algumas indústrias produzem e comercializam a farinha de mesocarpo de babaçu, utilizada na alimentação humana. Além destes, outros usos estão sendo dados aos subprodutos do babaçu. Do total da produção extrativista vegetal não madeireira, a produção de amêndoas de babaçu

(oleaginosos) atingiu 78 mil toneladas em 2015, gerando R$ 107,7 milhões, 47% do valor de produção da categoria (SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS, 2016). Estes aspectos ilustram a solidez da produção extrativista do coco babaçu no Brasil, e a relevância do manejo e destinação dos resíduos associados. A regularidade desta matéria-prima pode ser considerada uma vantagem para o desenvolvimento de novas rotas tecnológicas, pois oferece consistência ao surgimento de um mercado.

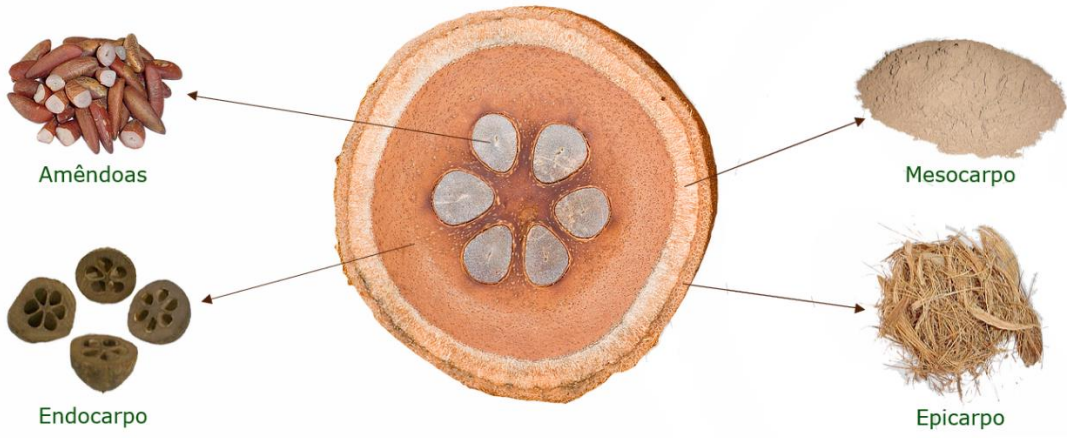


Figura 13: Composição do fruto do babaçu. O epicarpo, mais externo e fibroso, corresponde a 12,6% da massa do coco. O mesocarpo, rico em amido, compõe 20,4%. As amêndoas constituem 8,7% da massa total do coco e delas é obtido o óleo de babaçu. O endocarpo corresponde a 58,4% do fruto.

Figura 14: Um grupo de mulheres quebradeiras cooperativadas (à esquerda) reunidas para a quebra do coco babaçu (em detalhe, à direita). Fonte: http://www.tobasa.com.br.

3.7. SUBSTÂNCIAS LUBRIFICANTES

A maior parte dos fluidos lubrificantes é sintetizada a partir do petróleo, constituindo os óleos minerais e sintéticos. Estes, por sua vez, são conhecidos pela sua baixa biodegradabilidade e alta toxicidade ao meio ambiente. Lubrificantes de natureza biodegradável têm sido crescentemente desejados, especialmente em atividades onde vazamentos representam um alto risco para o meio ambiente. Alternativas a estes compostos, portanto, têm sido buscadas em substâncias renováveis como os óleos vegetais. Estes são vantajosos por serem biodegradáveis, por funcionarem como excelentes lubrificantes e por apresentarem um custo de obtenção inferior ao dos óleos minerais. Por outro lado, estes óleos costumam apresentar uma baixa resistência à oxidação, relacionada justamente à sua alta biodegradabilidade, além da redução de propriedades como a viscosidade e a fluidez quando aplicados em baixas temperaturas (DA SILVA et al., 2015). Seus atrativos despertam, no entanto, grande interesse na compreensão das características físico-químicas e tribológicas destes compostos, e especialmente, em processos que possam modificá-los e assim torná-los melhores candidatos ao aproveitamento como lubrificantes. O preço relativamente mais baixo do petróleo e a falta de apelo para o uso de produtos biodegradáveis e renováveis fez diminuir os investimentos em pesquisa e desenvolvimento dos biolubrificantes. Na década de 90, somente alguns fazendeiros de soja e o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos da América investiam em pesquisa no setor (GAPINSKI; JOESP; LEYZELL, 1994).

A função lubrificante é caracterizada por parâmetros como a viscosidade, a acidez, a corrosividade e a fluidez, refletindo no desempenho dos lubrificantes quanto à habilidade de reduzir o atrito, de resistir à oxidação, de minimizar a formação de depósitos e de impedir a corrosão e o desgaste (PROFITO et al., 2013). Estas características dependem do tipo de matéria-prima empregada, da natureza da catálise, das concentrações utilizadas no processo e do tempo e das condições de condução das reações, criando-se assim uma gama de substâncias de potencial lubrificante a serem estudadas e desenvolvidas.

O índice de viscosidade (IV) é um meio de se exprimir o grau de variação da viscosidade em função da temperatura. Quanto maior o índice, menor a variação de temperatura. Altos IV são desejáveis, visto que aumentam a previsibilidade de comportamento do lubrificante e a sua performance para uma determinada aplicação (RUDNICK, 2013).

Os óleos vegetais, devido à polaridade dos ésteres, aderem melhor às superfícies metálicas do que os óleos minerais, sendo mais bem-sucedidos na separação metal-metal (HONARY; RICHTER, 2011). Além disso, devido a um índice de viscosidade mais alto em

relação aos óleos de petróleo, eles são mais estáveis à medida que a temperatura muda. A soja, por sua vez, constitui uma matéria-prima abundante, com solidez no cultivo e manejo. A composição em ácidos graxos do óleo de soja pode ser vista na Tabela 1, e algumas características físico-químicas do óleo de soja e do óleo mineral podem ser comparadas na Tabela 2.

Tabela 1: Composição de ácidos graxos do óleo de soja.

Composição de ácidos graxos do óleo de soja (%)	**Palmítico (C16:0)**	**Esteárico (C18:0)**	**Oleico (C18:1)**	**Linoleico (C18:2)**	**Linolênico (C18:3)**
	2,3-11	**2,4-6**	**22-30,8**	**49-68,7**	**2-10,5**

Fonte: EMBRAPA, (2011)

Tabela 2: Viscosidade, índice de viscosidade e pontos de fluidez de óleos selecionados e fluídos hidráulicos idênticos à base de óleo de soja e óleo mineral.

DESCRIÇÃO	**Fluidez (°C)**	**Viscosidade a 40 °C**	**Viscosidade a 100 °C**	**Índice de Viscosidade**
Óleo de soja refinado rico em ácido oleico	**-16**	**31,19**	**8,42**	**200**
Óleo de soja bruto	**-6**	**31,69**	**7,59**	**222**
Óleo mineral - ISO VG 100	**-50**	**20,58**	**3,68**	**28**
Óleo mineral - ISO VG 500	**-32**	**96,21**	**9,04**	**53**
***Blend* de óleos minerais ISO VG 100 e ISO VG 500**	**-49**	**37,95**	**5,29**	**53**
Fluido hidráulico de óleo de soja bruto	**-4**	**32,26**	**7,59**	**217**
Fluido hidráulico de óleo de soja refinado	**-4**	**39,14**	**8,41**	**199**
Fluido hidráulico de *blend* de óleos minerais	**-11**	**25,24**	**4,25**	**46**

Adaptado de HONARY & RICHTER, (2011)

O óleo de soja tem um índice de viscosidade de cerca de 220, com uma viscosidade de 30,69 a 40 °C e uma viscosidade de 7,58 a 100 °C (Tabela 2). Como o índice de viscosidade alto resulta em uma viscosidade estável quando as temperaturas mudam, o fluido hidráulico a base de óleo vegetal de menor viscosidade pode ser usado em aplicações onde é necessário um óleo de petróleo de viscosidade mais alta (KANIA et al., 2015). Os pontos de fulgor e de ignição dos óleos vegetais também costumam ser consideravelmente maiores. Estas propriedades são adequadas para a criação de fluidos industriais e graxas de máquinas que poderiam atender a alguns padrões de ignificação.

Apesar de promissores, a modificação química é necessária para melhorar certas limitações de desempenho lubrificantes baseadas em ésteres, sem prejudicar suas excelentes propriedades tribológicas e ambientais. A otimização dos óleos naturais refere-se especificamente a propriedades tais como a estabilidade hidrolítica, a viscosidade, a evaporação (ponto de inflamação), a estabilidade à oxidação, a formação de espuma, etc. A poli-insaturação nas cadeias de ácidos graxos reduz a estabilidade à oxidação, enquanto que a saturação completa das duplas ligações resulta em baixo ponto fluidez (WILLING, 2001). Por conseguinte, o óleo vegetal em si acaba limitado a uma certa faixa de atuação, e isso restringe o uso de triglicerídeos em aplicações industriais que funcionam sob uma ampla faixa de temperatura. A modificação química dos triglicerídeos ajuda a construir moléculas com propriedades desejáveis para aplicações de lubrificantes, uma vez que todas as propriedades físicas e químicas do óleo vegetal são unicamente baseadas na estrutura molecular e na sua distribuição relativa (ERHAN; ASADAUSKAS, 2000). Projetar alterações na composição de ácidos graxos de óleos vegetais para uma aplicação industrial específica é uma tarefa desafiadora (DERKSEN, 1999).

Apesar de promissores, os óleos vegetais apresentam desvantagens cruciais para sua ampla utilização. A presença de hidrogênios na posição beta do arcabouço de glicerol nos triglicerídeos faz com que os óleos vegetais sejam sensíveis termicamente quando submetidos a altas temperaturas (HILL, 2000), e por isso não são geralmente apropriados para várias aplicações lubrificantes que requerem resistência ao calor. Uma maneira de adquirir esta estabilidade é modificar estes ésteres substituindo o glicerol por poliois que não contenham o hidrogênio-β (GRYGLEWICZ; PIECHOCKI; GRYGLEWICZ, 2003; NAGENDRAMMA, 2011) (Figura 15).

A maioria das modificações oleoquímicas (90%) dizem respeito à fração carboxila dos ácidos graxos, ao passo que as reações nas insaturações das cadeias representam apenas 10%

(HONARY; RICHTER, 2011). O foco está, de fato, na eliminação das funcionalidades críticas do hidrogênio do grupo β-CH (em relação ao grupo éster), para melhorar a estabilidade oxidativa (ERHAN; ASADAUSKAS, 2000; GRYGLEWICZ; PIECHOCKI; GRYGLEWICZ, 2003). A fração glicerol de triglicerídeos é facilmente degradada a altas temperaturas. Os compostos formados podem sofrer polimerização, aumentando a viscosidade e resultando finalmente em precipitados. Substituindo o glicerol por álcoois polihídricos tais como o neopentilglicol (NPG), o trimetilolpropano (TMP) ou pentaeritritol (PET) (Figuras 16 e 17), os quais não contém o hidrogênio-β, este problema é sanado (MANG; DRESEL, 2007). Embora tais ésteres sintéticos (ESs) também se decomponham em altas temperaturas, sua decomposição térmica ocorre lentamente.

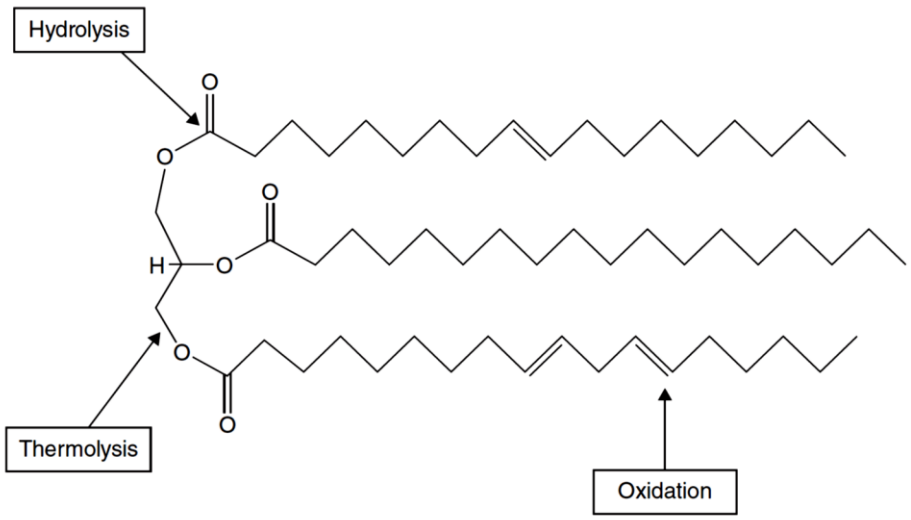


Figura 15: Estrutura esquemática dos triglicerídeos, mostrando posições vulneráveis à degradação química. Extraído de (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2012a).

3.7.1. POLIOL ÉSTERES

Os poliol ésteres (POEs) são moléculas obtidas quando todas as hidroxilas de um poliol (ou álcool alifático polihídrico) com pelo menos duas hidroxilas são esterificadas. Os ésteres de poliol incluem ésteres derivados de álcoois tais como Neopentilglicol (NPG), Trimetilolpropano (TMP) e Pentaeritritol (PE) (Figuras 16 e 17), os quais não contém o hidrogênio-β (GRYGLEWICZ; PIECHOCKI; GRYGLEWICZ, 2003; OH et al., 2013).

Comparados aos óleos vegetais, os POEs apresentam melhora na estabilidade térmica e oxidante, melhores propriedades lubrificantes, devido aos altos índices de viscosidade, e excelentes características de viscosidade a baixas temperaturas (NAGENDRAMMA, 2011). Os poliol ésteres exibem ainda uma boa biodegradabilidade, redução a volatilidade e boa resistência ao cisalhamento (RUDNICK, 2013). São muito desejados em aplicações altamente tecnológicas, nos setores automotivo e aeronáutico de ponta e como agentes dispersantes (DA SILVA; HABERT; FREIRE, 2013; GAPINSKI; JOESP; LEYZELL, 1994; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; OFFICE OF WASTEWATER MANAGEMENT, 2011). Seu excelente desempenho técnico permite que sejam usados em sistemas hidráulicos de alta pressão, alta temperatura e outros altamente estressantes. Os óleos de poliol ésteres parcialmente insaturados formam o maior grupo de lubrificantes rapidamente biodegradáveis, sendo produzidos por empresas como Exxon e Basf, e as especificações requeridas para óleos ésteres são especificadas pela norma ISO 15380 (GAULE, 2007).

A principal via de síntese destas moléculas é a transesterificação catalítica, podendo esta ser homogênea, heterogênea ou enzimática. A síntese química, por catálise homogênea ou heterogênea, consiste objetivamente de uma reação de transesterificação catalisada por um ácido ou base forte, e temperaturas entre 200 e 250 °C, eventualmente sob vácuo (GRESHAM; TOTTEN; SOCIETY OF TRIBOLOGISTS AND LUBRICATION ENGINEERS., 2009; LANSDOWN, 2003). Estas condições, além dos custos das matérias-primas, tornam a obtenção de POEs custosa, sendo, em alguns casos, semelhante ao custo dos aditivos químicos (BAIN & COMPANY, 2014b).

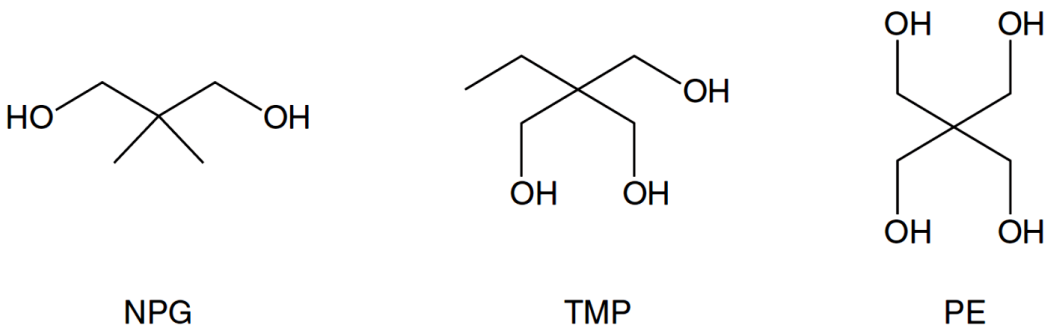


Figura 16: Poliois: Neopentilglicol (NPG), trimetilolpropano (TMP) e Pentaeritritol (PE). FONTE: (HE et al., 2004).

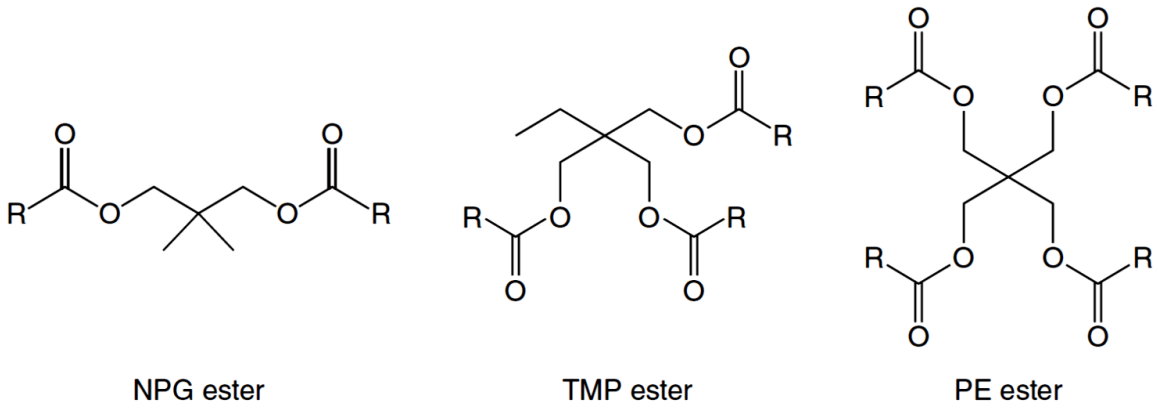


Figura 17: Ésteres de neopentilglicol (NPG), de Trimetilolpropano (TMP) e Pentaeritritol (PE). FONTE: (HE et al., 2004).

A síntese enzimática é realizada por lipases que serão detalhadas a seguir.

3.8. LIPASES

Lipases são triacilglicerol hidrolases (SZTAJER; MALISZEWSKA; WIECZOREK, 1988). Classificadas com a numeração E.C. 3.1.1.3 de acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB). Dentre as enzimas, as lipases são as mais usadas em tecnologia (JAEGER; EGGERT, 2002; NOËL; LOZANO; COMBES, 2005), porque reconhecem uma gama variada de substratos hidrolise e síntese de ligações éster, alcoólise, aminólise, peroxidações, epoxidações, interesterificações etc. Lipases podem ser obtidas de animais (pâncreas (1,3 específica), pré-gástrica de cabritos), vegetais (sementes de oleaginosas) ou micro-organismos (IWASAKI; YAMANE, 2000; JAEGER; EGGERT, 2002). Na indústria, são utilizadas desde a fabricação de emulsificantes na panificação, que aumentam o tempo de prateleira (por elevar a retenção de água e assim retardar a sinérese), na produção de ésteres aromáticos a partir de álcoois e ácidos (como o butirato de etila e o acetato de isoamila), na síntese de lipídeos estruturados de interesse nutracêutico, até a produção de fármacos e cosméticos, biodiesel, lubrificantes (GUPTA et al., 2015; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006).

A lipase do fungo filamentoso *Rhizomucor miehei* (RML) foi a primeira lipase cuja estrutura foi conhecida (resolvida a uma resolução de 1,9 Å), consistindo em uma proteína monomérica de 31.600 Da e de ponto isoelétrico 3,8 (BRZOZOWSKI et al., 1992). A estrutura

revelou uma tríade catalítica de tipo Serina-Histidina-Aspartato com uma serina ativa oculta sob um pequeno fragmento helicoidal de um loop de superfície longo (a tampa). A enzima foi descrita como uma única cadeia polipeptídica de 269 resíduos. É dobrado em um domínio de folha beta com feixes predominantemente paralelos, conectados por uma variedade de grampos, laços e segmentos helicoidais (Fig. 18) (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Um parâmetro importante para melhorar a performance e o uso das lipases em processos biotecnológicos é estabilidade da enzima. Diferentes estratégias têm sido estudadas para esta finalidade: a imobilização de enzimas em suportes variados (estabilização através do aumento da rigidez da proteína), mutagênese sítio-dirigida ou mutagênese aleatória (para aumentar a atividade e/ou a estereosseletividade) (RUEDA et al., 2016b; SANTOS et al., 2015).

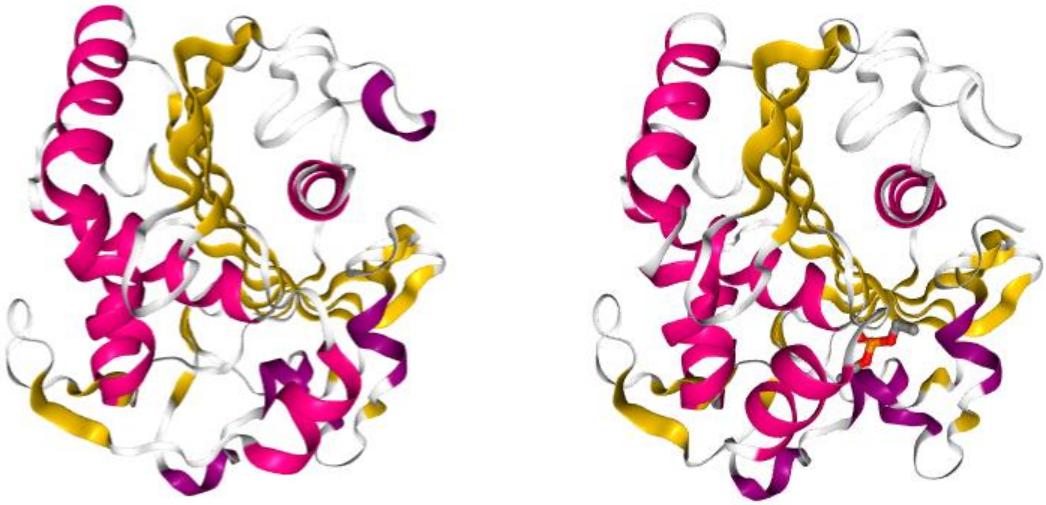


Figura 18: Estrutura tridimensional da lipase de *R. miehei* em sua forma fechada (A) e aberta (B) obtida do Protein Data Bank (PDB) em formato WebGL (NGL) em 16/11/2017. As cores salientam as diferentes estruturas secundárias.

A lipase de *R. miehei* é descrita como uma lipase 1,3 específica. Entretanto, sua especificidade pelas posições relativas 1 ou 3 pode ser diferente dependendo da reação. A posição preferencialmente atacada em reações de hidrólise, acidólise e interesterificação tende a ser oposta àquela observada em reações de esterificação (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; RODRIGUEZ et al., 2008). Esta especificidade e também a atividade podem ser alteradas não só pelas condições reacionais e substratos, mas também por metodologias de imobilização de enzimas (CHO; RHEE, 1993). Assim, diferentes estratégias

reacionais e substratos podem investigados para aumentar o leque de utilização biotecnológica destas enzimas.

Uma das etapas mais críticas da síntese enzimática é a escolha do biocatalisador. O biocatalisador enzimático pode ser aplicado em sua forma livre, imobilizado em suportes geralmente poliméricos ou aderidos ainda à face extracelular das células produtoras, estes últimos chamados comumente de catalisadores "whole-cell" (DE CARVALHO, 2011; GEIER et al., 2015). A escolha da forma de aplicação dependerá primeiramente do tipo de substrato a ser transformado. Certos substratos reduzem drasticamente a atividade enzimática de enzimas livres, e, nestes casos, o uso da enzima em uma versão imobilizada por pode ser a escolha necessária para viabilizar a síntese (RUEDA et al., 2016a). Os suportes, além de estabilizar as enzimas, também são conhecidos por serem capazes de modificar a especificidade e a taxa sintética destas proteínas (SANTOS et al., 2015). Além disso, devido a variada possibilidade de densidades e tamanhos dos suportes que vem sendo desenvolvidos, incluindo os suportes magnéticos, a imobilização também se revela um recurso com poder de facilitar a recuperação das enzimas em certas etapas das sínteses.

O tipo e a aplicação das moléculas resultantes da biocatálise também influenciam na escolha da enzima. Se nesta escolham pesam características catalíticas, como regio e enantiosseletividade, já discutidas anteriormente, o propósito das moléculas produzidas é um outro fator de grande relevância. O grau de pureza e a recuperação sem resíduos do catalisador são determinantes na prospecção de enzimas aplicáveis na indústria farmacêutica ou alimentícia. O custo destas etapas de recuperação e das etapas de produção de um biocatalisador também precisam estar alinhados ao valor agregado da molécula produzida. Neste contexto, os biocatalisadores obtidos por FES podem ser prontamente aplicados em tratamento de efluentes (ALEXANDRE et al., 2011; CAMMAROTA; FREIRE, 2006; GUTARRA et al., 2009; LEAL et al., 2006; ROSA et al., 2009) e nas áreas de bioenergia e biocombustíveis, possuem um custo de produção significativamente menor do que os catalisadores enzimáticos comerciais disponíveis e podem ser recuperados por lavagem com solventes de baixo custo (AGUIEIRAS et al., 2014; GODOY et al., 2011a; SILVA et al., 2014) ou ainda por decantação, como demonstrado no presente trabalho.

3.9. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES)

A produção de lipases envolve principalmente processos fermentativos e, industrialmente, a maior parte dos processos biotecnológicos utiliza fermentação submersa. No entanto, processo de fermentação em estado sólido (FES) vem recebendo destaque como uma alternativa promissora para a produção de diversos produtos de interesse industrial (GUTARRA et al., 2009).

Na FES, sólidos úmidos são utilizados como fonte de nutrientes e suporte para o crescimento microbiano, que pode ocorrer na superfície ou no interior do material sólido (KUMAR; LONSANE, 1990; LONSANE et al., 1985). Nesse tipo de fermentação, a quantidade de água no meio sólido deve ser mantida em um nível que assegure o crescimento e metabolismo microbiano, mas que não exceda a capacidade máxima de retenção de água na matriz (RAHARDJO; TRAMPER; RINZEMA, 2006). Ao contrário dos cultivos submersos, nos quais as células estão envoltas de meio completamente líquido, a Fermentação em Estado Sólido (FES) é um sistema de crescimento microbiano onde o meio é composto por partículas sólidas, que podem chegar a 70% da massa total do sistema, e onde a quantidade de água é próxima à capacidade máxima absorvida pelo material sólido, sendo o suficiente para permitir o crescimento do micro-organismo (MITCHELL; BEROVIČ; KRIEGER, 2006). Fungos filamentosos são os micro-organismos mais robustos para o crescimento nesse tipo de sistema, pois produzem enzimas extracelulares, o que reduz os custos com extração e isolamento das enzimas e possuem maior tolerância à baixa atividade de água presente nesses meios (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006). Além disso, a penetração de hifas no interior das partículas permite uma maior acessibilidade aos nutrientes quando comparada a micro-organismos unicelulares, reduzindo a distância em que os processos de difusão devem ocorrer. Essa adaptação pode estar relacionada ao fato de que o meio contendo sólidos úmidos fornece a esses micro-organismos condições ambientais semelhantes ao seu habitat natural (HÖLKER; LENZ, 2005; VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003).

Dentre as inúmeras vantagens desse tipo de fermentação merece destaque a possibilidade de utilização de resíduos sólidos agroindustriais de baixo custo para o crescimento dos micro-organismos. Resíduos como farelos, tortas, cascas, bagaço e sementes de frutas podem ser utilizados como matérias-primas potenciais em bioprocessos, uma vez que atuam como excelentes suportes e oferecem nutrientes como carbono e nitrogênio para o crescimento do micro-organismo (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015; AMORIM et al., 2017; GODOY et al., 2011a; GUTARRA et al., 2005, 2009) além de serem baratos e

abundantes em países como o Brasil (SCHNEIDER et al., 2012). Em análise econômica conduzida por CASTILHO et al. (2000) sobre dos custos de produção de lipase por *Penicillium restrictum* por FES e FS, foi observado que a produção da lipase por FES necessitou de um investimento 78% menor em relação ao processo de FS. Além disso, a obtenção de um produto mais concentrado devido a menor quantidade de água no sistema, a maior produtividade e a obtenção de produtos muitas vezes com características mais interessantes para um determinado processo são algumas das vantagens da FES (VINIEGRA-GONZÁLEZ et al., 2003). Uma explicação para a obtenção de altas produtividades por FES reside no fato de que, nesse processo, as condições de cultivo são similares ao habitat natural dos fungos filamentosos (HOLKER; HOFER; LENZ, 2004). A maior produtividade em FES também poderia estar relacionada às diferenças fisiológicas no crescimento dos micro-organismos (VINIEGRA-GONZALEZ et al., 2003; DIAZ et al., 2006). A menor repressão catabólica observada em FES, quando comparada à fermentação submersa (FS), que ocorre devido à dificuldade de transferência de massa de gases e nutrientes na FES também tem sido reportada (DE AZEREDO et al., 2007).

Os subprodutos macerados resultantes da extração de óleos, também chamados de tortas, podem ser de dois tipos: comestíveis e não-comestíveis. As tortas de óleos comestíveis possuem alto valor nutricional e são frequentemente utilizadas na alimentação de ruminantes e peixes, devido ao seu alto teor proteico (15% a 50%) (AGUIEIRAS et al., 2014). Já as tortas de óleos não comestíveis, como as de mamona, são utilizadas como fertilizantes, devido aos seus altos teores de nitrogênio, fósforo e potássio (GUTARRA et al., 2005). Alguns desses óleos aumentam a captação de nitrogênio pelas plantas e também podem protegê-las de nematódeos, insetos e parasitas (GUPTA et al., 2015; RAMACHANDRAN et al., 2007). Visando agregar mais valor a esses resíduos, diversos estudos têm avaliado a possibilidade de sua utilização como substratos para a produção de diferentes produtos microbianos. Tortas como as de girassol, milho, babaçu, soja, palma, oliva, amendoim, mostarda, cevada, trigo, algodão e canola podem ser empregadas na produção de enzimas (BROINIZI et al., 2007; DE AZEREDO et al., 2007; DE CASTRO et al., 2010; GOMBERT et al., 1999; GUPTA et al., 2015; SELWAL et al., 2011), aromas (DA PENHA; DA ROCHA LEÃO; LEITE, 2012), biopesticidas (DE VRIJE et al., 2001), pigmentos (VELMURUGAN; SREEDHAR; SWAMINATHAN, 2011), ácidos orgânicos (CAMPANHOL et al., 2019; DHILLON et al., 2011; VANDENBERGHE et al., 2000) e outros bioprodutos. Trabalhos também têm demonstrado o potencial de aplicação da FES na detoxificação de resíduos que contêm compostos antifisiológicos e antinutricionais,

como as tortas de mamona (GODOY et al., 2009, 2011a; MADEIRA; MACEDO; MACEDO, 2011), de pinhão-manso (JOSHI; MATHUR; KHARE, 2011; VEERABHADRAPPA; SHIVAKUMAR; DEVAPPA, 2014) e resíduos cafeinados (BRAND et al., 2000) visando a formulação de ração animal. Dessa forma, a utilização dessas tortas em processos biotecnológicos como substrato para FES reduz os custos do processo fermentativo e agrega valor aos resíduos agroindustriais (GUTARRA et al., 2009).

Cabe ressaltar que apesar das vantagens da FES, este processo apresenta algumas desvantagens como: formação de gradientes de temperatura, umidade e concentração de substrato, devido à baixa condutividade dos substratos sólidos utilizados e à reduzida quantidade de água; dificuldade de monitoramento do crescimento microbiano e de variáveis como agitação, aeração e concentração de nutrientes e produtos; e dificuldade de remoção do calor gerado pelo metabolismo microbiano, sendo esse o principal problema de escalonamento do processo (HÖLKER; LENZ, 2005; THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Como a grande maioria dos micro-organismos utilizados em FES é mesofílica, com temperatura ótima de crescimento entre 20 e 40 ºC, em larga escala as temperaturas no interior do leito podem alcançar valores muito superiores à temperatura ótima de crescimento do micro-organismo, podendo limitar seu crescimento e a formação de produtos, assim como desnaturar produtos termolábeis como enzimas (THOMAS; LARROCHE; PANDEY, 2013). Outra dificuldade desse processo é o escalonamento para a obtenção de grandes quantidades de suspensão de esporos, que são empregados como inóculo na FES (GUTARRA et al., 2007). O uso de sólidos fermentados, obtidos em menor escala por FES, como inóculo representa uma alternativa interessante, especialmente para aplicação da FES em maior escala. Essa estratégia foi investigada por GUTARRA et al. (2007), que observaram um aumento de 50% na atividade e produtividade de lipases produzidas por FES em comparação aos resultados obtidos utilizando suspensão de esporos como inóculo. Segundo os autores, o uso de sólidos fermentados como inóculo para FES reduz a fase adaptativa (LAG), permitindo uma rápida produção das lipases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MICRO-ORGANISMO

Foi utilizado o fungo *Rhizomucor miehei*, descrito como produtor de uma das lipases fúngicas comerciais mais empregadas (ALCÁNTARA et al., 1998). Para a obtenção dos esporos, o fungo foi propagado em estufa por 7 dias a 30 °C, em meio PDA (Potato Agar Dextrose). O fungo pertencente à coleção de cultura do Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) é conservado em meio PDA coberto com óleo mineral, armazenado a 4 °C. Os esporos foram removidos com auxílio de pérolas de vidro e recuperados em tampão fosfato de sódio (50 mM, pH 7,0), formando uma suspensão (SILVA, 2014). A concentração dos esporos foi determinada por contagem em microscópio óptico utilizando câmara de Neubauer.

4.2. FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO (FES) PARA OBTENÇÃO DO PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO (PES)

Para a obtenção do PES foi aplicada metodologia descrita em Aguieiras (2015). Foram empregados biorreatores do tipo bandeja cilíndricos com 10 cm de diâmetro e 15 cm de altura. Foram utilizados com 15 g de torta de babaçu, perfazendo uma altura de leito de 1 cm, sem suplementação, com umidade ajustada para 65%. Como inóculo foram utilizados 10^7 esporos/g de massa seca de torta, obtidos por meio da suspensão preparada conforme item 4.1. Como meio de cultivo foi empregada torta de babaçu moída e peneirada, sendo utilizadas as partículas de diâmetro inferior a 1,18 mm. As fermentações foram conduzidas em câmara climática com injeção de ar úmido com 90% de saturação a 30 °C por 72 h. Ao final da fermentação, o meio fermentado foi liofilizado e estocado a 4 °C até utilização. Este sólido liofilizado, composto por torta de babaçu fermentada por *R. miehei*, o fungo e suas enzimas é nomeado Preparado Enzimático Sólido (PES), e empregado nas reações em reator e nos zimogramas deste trabalho.

4.3. OBTENÇÃO DO EXTRATO ENZIMÁTICO BRUTO

Para extração das enzimas do PES, foi utilizada metodologia descrita por Silva e aprimorada por Aguieiras (AGUIEIRAS, 2015; SILVA, 2014). Foram adicionados 5 ml de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) para cada grama de fermentado a ser extraído. A extração do PES foi realizada em agitador rotatório a 35 °C e velocidade de agitação de 200 rpm por 20 minutos. Posteriormente, a torta foi prensada para a obtenção do extrato enzimático bruto, o qual foi centrifugado a 3000 g por cinco minutos para remoção de sólidos mais finos (GOMBERT et al., 1999). O extrato final, chamado de extrato enzimático bruto, foi empregado para determinação da atividade hidrolítica e para os zimogramas.

4.4. PROSPECÇÃO DE SUBSTRATOS POR ZIMOGRAFIA

O biodiesel metílico de soja e o de mamona utilizados nas reações foram cedidos pela gerência de Hidrorrefino e Processos Especiais (HPE) do CENPES – Petrobras. A concentração de proteínas totais do extrato enzimático bruto (Item 4.3) foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, M.M., 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão. Os extratos foram submetidos à eletroforese parcialmente desnaturante em gel de poliacrilamida 12% (m/v) a 180 V a 8 °C, em tampão de corrida contendo 1,4% de glicina (m/v), 0,3% de Tris (m/v) e 0,01% de SDS. Foram aplicados 30 µg de proteína por poço. Foi utilizado o sistema de cuba úmida MINIPROTEIN Tetra Cell da BIORAD para a corrida eletroforética. Com o término da corrida, o gel foi corado com solução de Comassie (Comassie R-250 a 0,1% (m/v); metanol 40% (v/v) e ácido acético glacial 10% (v/v)) por uma hora e descorados em solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) (Laemmli, U.K., 1970). Um marcador de massa molecular pré-corado (SeeBlue® Plus 2 Novex, Life Technologies) correu simultaneamente às amostras.

Para os zimogramas de atividade de transesterificação e esterificação, o gel resultante da migração eletroforética foi lavado para remoção do SDS utilizando 1% de Triton X-100 em tampão fosfato 0,01 M, pH 7.0 por 20 min. O gel foi lavado em água destilada e posteriormente reequilibrado com tampão fosfato 0,01 M, pH 7.0, sendo então submetido à reação. Os meios reacionais foram compostos de misturas obtidas em emulsionador, formadas pela combinação de biodiesel metílico de mamona, biodiesel metílico de soja, ácidos graxos de soja ou ácidos graxos de mamona com os poliálcoois trimetilolpropano ou neopentilglicol, a 42 °C, sob lenta

agitação (200 rpm), por 24 h ou 72 h. Após a imersão do gel no meio reacional, observa-se a formação de depósitos de coloração branca na malha, que formam bandas que se sobrepõem às bandas proteicas observadas no SDS-PAGE.

4.5. REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO EMPREGANDO O PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO DE *Rhizomucor miehei* COMO BIOCATALISADOR

O biodiesel metílico de soja e o de mamona utilizados nas reações foram cedidos pela gerência de Hidrorrefino e Processos Especiais (HPE) do CENPES – Petrobras. As reações de transesterificação entre o biodiesel de soja e o poliálcool neopentilglicol (NPG) foram conduzidas em reator batelada aberto, com capacidade de 30 ml provido de agitação magnética. A temperatura do meio reacional foi mantida constante pela circulação de água pela camisa do reator. O meio reacional consistiu na mistura dos substratos (biodiesel de soja e poliálcool) e do PES (20% m/m). A quantidade de álcool empregada na reação foi determinada considerando resultados anteriores obtidos com a enzima comercial de *R. miehei* Lipozyme RM-IM. Primeiramente, foram conduzidas reações de 48 h variando-se a temperatura (40 °C ou 50 °C) e o teor de água do meio reacional (0%, 1% ou 2% m/m). A razão molar inicial de biodiesel/poliálcool foi de 3,75:1. Após a solubilização prévia dos substratos à 50 °C, as temperaturas foram ajustadas, quando necessário, e então adicionou-se 20% de PES liofilizado. Os controles negativos de reação foram também realizados nas mesmas condições com o intuito de verificar se a reação de transesterificação estava de fato ocorrendo devido à ação catalítica das lipases presentes no PES. Os controles foram: reação sem o PES e a reação com substituição do PES por torta de babaçu. O progresso das reações foi medido pela retirada de alíquotas do meio reacional, que foram submetidas à cromatografia gasosa e análise titulométrica para determinação do percentual de conversão, como descrito nos itens 3.5.2, 3.5.3 e 3.5.4. As medidas do percentual de conversão e do teor de acidez foram submetidas a análise de variâncias por ANOVA. A Figura 19 ilustra o sistema de reações em batelada de bancada empregado nas reações aqui descritas.

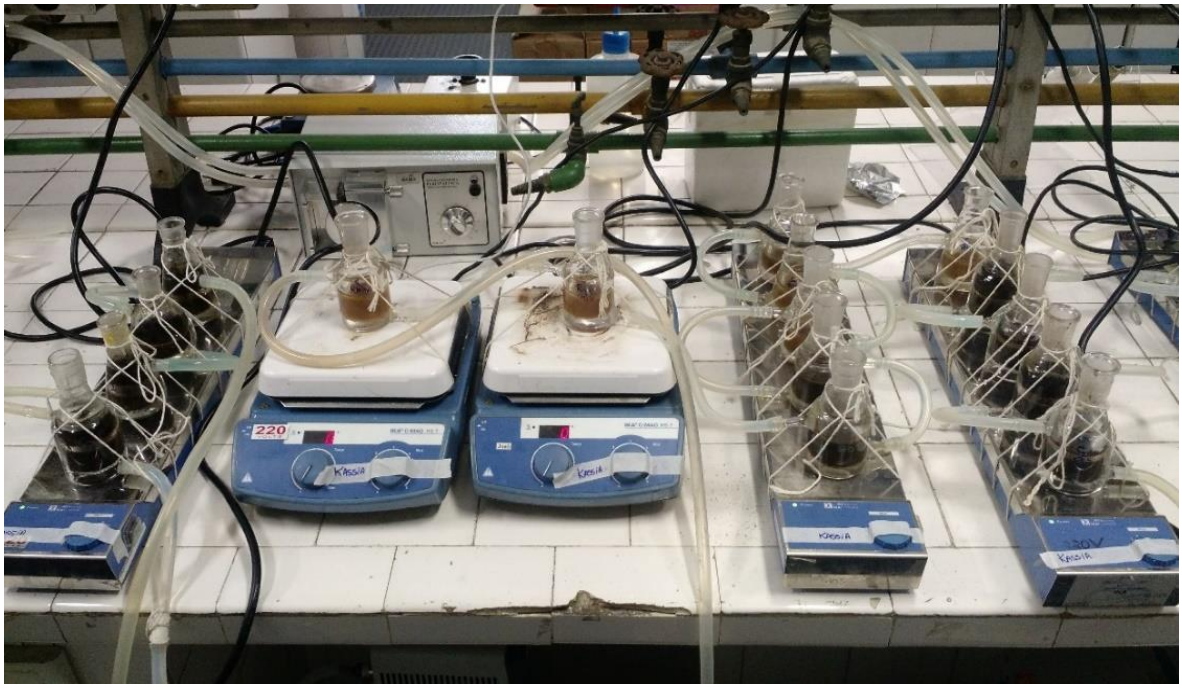


Figura 19: Fotografia dos reatores de bancada durante reações de transesterificação com a lipase comercial ou o PES de *R. miehei* como catalisador.

4.6. METODOLOGIAS ANALÍTICAS

4.6.1. Medida da atividade de hidrólise

A atividade de hidrólise do PES foi estimada mediante a variação de absorbância em espectrofotômetro promovida pela hidrólise do substrato p-nitrofenil laurato (p-NFL) pelo extrato enzimático líquido, como descrito na literatura (AGUIEIRAS et al., 2014; SILVA, 2014). A absorbância foi acompanhada no espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800) a 412 nm. Uma unidade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio. O cálculo da atividade é realizado utilizando a Equação 1:

$$Atividade(U/mL) = \frac{\alpha \times D \times f \times V_f}{V_s} \qquad \text{(Equação 1)}$$

Onde:

α = variação de absorbância (ΔAbs) no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorbância;

D = diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão (0,094 μmol.L^{-1}), obtido através da construção de uma curva padrão do p-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 μmol.ml^{-1};

Vf = volume reacional, que é o volume da solução de p-NPL em tampão e o volume da amostra (ml);

Vs = volume da solução enzimática utilizada no ensaio (ml).

A atividade de hidrólise expressa por grama de torta seca (U/g) foi calculada pela Equação 2:

$$Atividade(U/g) = \frac{(U/mL) \times V_t}{m} \qquad \text{(Equação 2)}$$

Onde:

Vt = volume de tampão utilizado na extração da enzima;

m = massa seca de torta.

4.6.2. Determinação da atividade de esterificação do PES

A atividade de esterificação das lipases foi determinada pelo consumo de ácido oleico na reação de esterificação do ácido com etanol (AGUIEIRAS, 2015; SILVA, 2014), empregando razão estequiométrica dos reagentes (razão molar ácido oleico/etanol = 1), e 3% (m/m) de lipase comercial ou de extrato enzimático bruto de PES a 40 °C. A reação foi conduzida em reator batelada fechado com capacidade de 30 ml, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático. O progresso das reações foi acompanhado retirando-se alíquotas do meio reacional (100 μl, em duplicata), que foram analisadas por titulometria de neutralização. As amostras foram dissolvidas em 40 ml de acetona/etanol 1:1 e tituladas contra uma solução de NaOH a 0,04 mol.L^{-1}, empregando titulador automático Mettler modelo DG20. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que consome 1 μmol de ácido oleico por minuto nas condições experimentais descritas. A Equação

4 descreve o cálculo empregado para determinação da taxa de consumo de ácido nas reações de esterificação.

$$Q_H\ (\mu mols/\min.g) = \frac{(V_1 - V_2) * C * V_m * 1000}{t * m * V_a} \quad \text{(Eq. 4)}$$

Onde:

Q_H = taxa de consumo de ácido oleico (μmol de ácido graxo consumido por minuto por grama de enzima (μmol/min.g));

V_1 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo zero de reação (ml);

V_2 = volume de NaOH consumido na titulação da amostra retirada no tempo t minutos de reação (ml);

C = concentração da solução de NaOH ($mol.L^{-1}$);

t = tempo de reação (min);

m = massa de preparação enzimática utilizada na reação (g);

V_a = volume de amostra (ml);

V_m = volume de meio reacional (ml).

4.6.3. Determinação da acidez das reações

O teor de ácidos graxos livres nos reagentes e produtos foi determinado por titulometria de neutralização. Os ácidos graxos livres foram titulados com solução de NaOH em titulador automático Mettler modelo DG20 até o valor de pH 11,0 e a acidez da amostra foi determinada pela Equação 3, como descrito por Aguieiras e colaboradores (2014) .

$$Acidez\ (\%m/m) = \frac{V \times M \times AG}{10 \times m} \qquad \text{(Equação 3)}$$

Onde:

V = volume de soda utilizado na titulação da amostra (ml);

M = molaridade da solução de NaOH (mol.L^{-1});

AG = massa molar do ácido graxo presente em maior concentração no óleo* (g);

m = massa de amostra (g).

*Óleo de soja= ácido linoleico (280 g/mol); Óleo de mamona= ácido ricinoleico (298 g/mol).

4.6.4. Determinação do teor de ésteres metílicos

Para determinar o teor do éster metílico (biodiesel) nos produtos das reações de transesterificação, foi utilizado cromatógrafo a gás (SHIMADZU 2010) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar Omegawax (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme), com conforme Aguieiras (2015). Heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno e o teor de ésteres foi calculado por meio da Equação 4.

$$Teor\,de\,éster(\%m/m) = \frac{massa_{padrão} \times área_{éster} \times 100}{área_{padrão} \times massa_{amostra}} \qquad \text{(Equação 4)}$$

4.6.5. Conversão da reação de transesterificação

A conversão da reação de transesterificação foi calculada segundo a Equação 5. Os resultados estão expressos na forma de porcentagem de biodiesel transesterificado, desconsiderando o excesso de biodiesel nas reações e os ácidos graxos livres formados, de forma que 100% de conversão equivale a 100% das hidroxilas do álcool esterificadas.

$$Conversão\ incluindo\ acidez\ (\%hidroxilas) = \frac{100 \times (E_i - (E_f + (A_f - A_i))) \times RM}{H \times E_i}$$

(Equação 5)

Onde:

Ei = teor de éster inicial (%m/m);

Ef = teor de éster final (%m/m);

Ai = acidez inicial (%m/m);

Af = acidez final (%m/m);

RM = razão molar inicial biodiesel/álcool;

H = número de hidroxilas na molécula do álcool.

4.6.6. Planejamento experimental

Para avaliar a influência dos parâmetros temperatura, teor de água e razão molar na reação de interesse e alcançar um modelo otimizado, foi realizado um planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), para o qual foram considerados os 3 fatores já citados: o teor de água no meio reacional, a razão molar entre os substratos (biodiesel de soja e poliálcool) e a temperatura reacional. Estes fatores foram variados em cinco níveis, como visto na Tabela 3. Foram realizados 17 ensaios, sendo a triplicata do ponto que contempla os níveis centrais do planejamento, somados com 8 ensaios para os pontos fatoriais e mais 6 ensaios para os pontos axiais. Os ensaios podem ser observados na matriz disposta na tabela 5 na Seção 5.3.2 dos Resultados. As análises estatísticas dos resultados foram feitas utilizando o software Statistica 7.0.

Tabela 3: Variáveis e níveis do Planejamento experimental do tipo DCCR para otimização da produção de biolubrificante.

Variáveis	**Níveis**				
	-1,68	-1	0	1	1,68
Teor de Água (% m/m)	0	1	2,5	4	5
Razão molar	2:1	2,45:1	3,1:1	3,75:1	4,2:1
Temperatura (°C)	36,6	40	45	50	53,4

4.7. ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) PARA MONITORAMENTO *IN SITU* DE REAÇÕES QUÍMICAS

As análises foram realizadas no sistema espectrofotométrico de infravermelho médio com transformada de Fourier da Bruker, modelo Bruker-MF+, com sonda imersível de fibra óptica, que permite a leitura de reações em tempo real, uma vez que dispensa qualquer preparação da amostra. Os espectros foram obtidos em modo de transmitância, com faixa de medição em números de onda (v), que são o inverso da frequência (f), entre 3500 cm^{-1} e 650 cm^{-1}, no infravermelho médio. As reações foram conduzidas por 72 h com razão molar BDS:NPG de 2:1 ou 3,1:1, 2,5% de água, 45 °C, 20% de PES. A aquisição dos interferogramas ocorreu com intervalos de 10 minutos. Como controles do processo, foram capturados interferogramas do biodiesel de soja puro, da água destilada, do meio reacional anterior à adição do PES, do PES dissolvido em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 (simulando a extração das enzimas, tal como descrito no item 4.3), do mesmo tampão fosfato puro e do NPG fundido.

4.8. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO BIOLUBRIFICANTE

Para a caracterização do biodiesel obtido, foram realizadas reações em maior escala, com o objetivo de produzir o volume final (200 ml de produto) necessário para avaliação das propriedades do produto. As reações foram conduzidas em reatores encamisados de 300 ml de volume providos de agitação mecânica. As análises para determinação das características físico-químicas dos produtos foram conduzidas pela Gerência de Produtos Especiais e Lubrificantes do CENPES/PETROBRAS, em conformidade com as metodologias descritas na Resolução ANP 14 de 11/05/2012. Foram analisadas a viscosidade a 40 °C e a 100 °C, de acordo com a norma ASTM D445 (ASTM, 2019), o Índice de Viscosidade, aplicando a norma ASTM D2270 (ASTM, 2016), o Ponto de Fluidez por ASTM D97 (ASTM, 2017), a Estabilidade Oxidativa pela Bomba Rotatória – RPVOT ASTM D2272 (ASTM, 2014) e o Índice de Acidez Total – IAT ASTM D974 (ASTM, 2017).

4.9. COMPARAÇÃO DO PES DE *Rhizomucor miehei* COM A LIPASE COMERCIAL LIPOZYME RM-IM

A eficiência do PES foi avaliada a partir da comparação das conversões obtidas nas reações de transesterificação entre BDS e NPG empregando o PES de *R. miehei* e a lipase comercial Lipozyme RM-IM (lipase 1,3 específica de *Rhizomucor miehei*, imobilizada em resina de troca iônica) como biocatalisadores. As reações foram conduzidas durante 120h, utilizando as duas melhores condições apontadas pelo planejamento experimental: razão molar BDS:NPG de 2:1 ou 3,1:1, 2,5% de água, 45 °C, 20% de PES ou 4% de Lipozyme RM-IM. As alíquotas reacionais foram retiradas nos intervalos de 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h.

4.10. ESTUDO DA REUTILIZAÇÃO DO PES DE *Rhizomucor miehei* E DA LIPASE COMERCIAL LIPOZYME RM-IM NAS REAÇÕES DE TRANSESTERIFICAÇÃO

Para o estudo da reutilização do PES, e sua comparação com a eficiência de reutilização da lipase comercial RM-IM foram realizadas reações consecutivas em batelada, cada uma de 72 h, conforme descrito no item 4.4. As condições utilizadas foram as que propiciaram as melhores conversões finais nas cinéticas conduzidas no item 4.9: razão molar BDS:NPG de 3,1:1, 2,5% de água, 45 °C, 20% de PES ou 4% de Lipozyme RM-IM. Após 72 h de reação, o PES foi lavado com 80 ml de etanol ou de hexano, o meio foi filtrado a vácuo e o solvente evaporado no rotaevaporador. O biolubrificante recuperado foi filtrado em papel de filtro. O PES foi mantido por 24 h em dessecador e utilizado em uma nova batelada de reação. Uma segunda forma de reutilização do PES foi realizada sem a etapa de lavagem com solventes seguida de filtração. Para tal, após 72 h de reação, a agitação foi interrompida para permitir a decantação do PES, como ilustrado na Figura 20. Em seguida, o sobrenadante foi removido e pesado. A massa removida foi utilizada para o cálculo da reposição de matéria-prima em cada reator, e após a adição, retomou-se a agitação e reiniciou-se a reação por 72 h. A conversão das hidroxilas do poliálcool foi determinada como descrito nos itens 4.6.2., 4.6.3. e 4.6.4. O biocatalisador foi utilizado em 5 reações sucessivas.

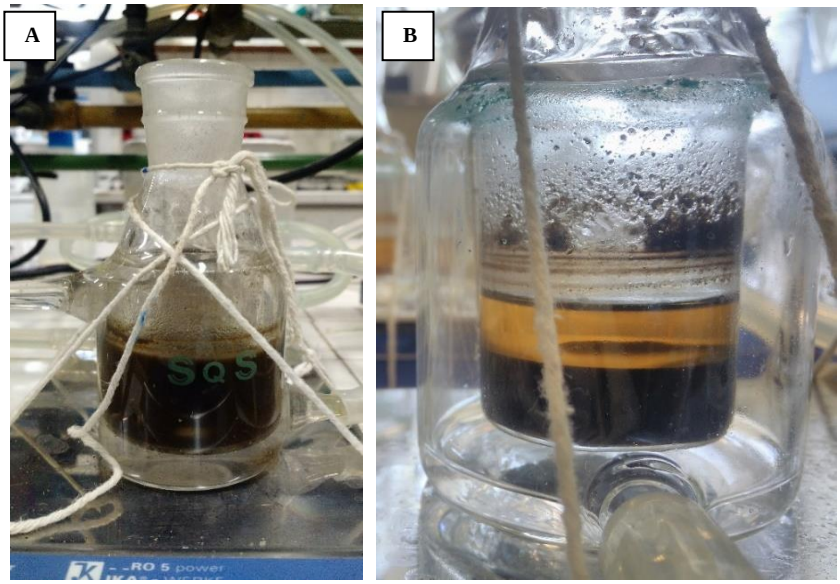


Figura 20: Fotografias dos reatores de bancada durante reações de transesterificação com o PES de *R. miehei* como catalisador. Em A, o meio reacional e o PES estão sob agitação, mantendo-os homogeneamente distribuídos. Em B, o PES foi decantado durante duas horas, quando então o meio reacional sobrenadante é removido.

4.11. Ensaio de biodegradabilidade imediata

Uma amostra do lubrificante foi submetida a um teste de biodegradabilidade imediata, conforme a norma OECD 301B (OECD, 1992). O princípio geral do teste é a incubação de uma quantidade pequena de suspensão microbiana contendo uma variedade de micro-organismos aeróbios em água e sais minerais, a uma temperatura de 20 ºC a 25 ºC, no escuro, ao longo de 28 dias. São utilizados os seguintes tratamentos:

A. Branco - solução de origem mineral (em duplicata);

B. Solução padrão de biodegradabilidade - benzoato de sódio contendo 20 mg de carbono/L;

C. Substância teste - o biolubrificante na concentração de 10 mg de carbono/L (em duplicata);

D. Inibição - benzoato de sódio (20 mg de carbono/L) e substância teste (10 mg de carbono/L).

A biodegradação é medida indiretamente pelo parâmetro da produção de gás carbônico proveniente da metabolização do material adicionado ao teste através de titulometria. Uma amostra de 1082 g do lubrificante foi enviada para a empresa Meriéux NutriSciences (Bioagri Laboratórios Ltda, Piracicaba, São Paulo, Brasil) para a realização do ensaio em duplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRODUÇÃO DO PREPARADO ENZIMÁTICO SÓLIDO DE *Rhizomucor miehei* EM TORTA DE BABAÇU

O preparado enzimático sólido foi obtido após a fermentação da torta de babaçu pelo fungo *R. miehei* por 72 h e subsequente liofilização, conforme metodologia de produção e secagem desenvolvida pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Microbiana na tese de Silva (2014), aprimorada por Aguieiras (2015) e descrita neste trabalho no item 4.2. No presente trabalho, o PES produzido apresentou cerca de 40,2 U/g de atividade hidrolítica/lipolítica e 32 U/g de atividade de esterificação, conforme metodologias descritas nos itens 4.6.1 e 4.6.2, mantendo semelhança com os resultados de atividade lipolítica e de esterificação obtidos por Aguieiras (41 U/g e 31 U/g, respectivamente). Estes resultados indicam a reprodutibilidade da metodologia de produção por FES deste biocatalisador e a estabilidade da cepa de *R. miehei* aplicada. Aguieiras também avaliou, no mesmo trabalho, a estabilidade do PES por meio do monitoramento da atividade lipásica e de esterificação da enzima estocada sob refrigeração, concluindo que o biocatalisador se mantinha estável pelos 12 meses em que foi avaliado consolidando o uso deste PES como promissor.

5.2. ZIMOGRAMA PARA PROSPECÇÃO DE BIOCATALISADORES

A prospecção de enzimas para um bioprocesso pode demandar grandes quantidades de matéria-prima e de biocatalisador. Isso se deve à necessidade de simular os ensaios em reator, além do tempo e custo dispendido com análises de cromatografia gasosa e titulometria para avaliar os resultados das reações. Muitas vezes, o biocatalisador, as matérias-primas ou mesmo a própria síntese pode não ter suas características completamente compreendidas, levando à necessidade de se investigar as condições reacionais necessárias, aumentando o volume de insumos. Nesse contexto, os zimogramas constituem uma alternativa para esta investigação inicial, caso seja possível reproduzir, em condições aplicáveis ao gel de eletroforese, as condições reacionais que se deseja estudar (KWON et al., 2011). Contudo, as metodologias de zimograma encontradas na literatura utilizam meios reacionais aquosos para determinação da atividade de esterificação (GODOY et al., 2011a; JOHRI et al., 2001). Esses meios contém os

substratos de interesse, mas a base aquosa torna o meio muito pouco fidedigno às condições reacionais que serão de fato empregadas. Desta forma, foram realizados zimogramas livres de água com o objetivo de identificar o potencial das enzimas do PES para as reações de transesterificação de interesse. Na Figura 21, observa-se os resultados positivos para a síntese de biolubrificante a partir de BDS e NPG após 30 horas de incubação. O extrato bruto apresentou uma banda entre 40 e 50 kDa (Figura 20, SDS-PAGE: PES2), não condizente com a massa molar da lipase de *R. miehei* descrita na literatura, que é de 32 kDa (Huge-Jensen, B. *et al*, 1987; Wu, X. *et al*, 1996), que apresentou forte atividade de transesterificação entre o BDS e o NPG (Figura 20, T: PES2). A mesma banda não foi encontrada no extrato proveniente da torta de babaçu, indicando que esta se trata de uma proteína produzida pelo fungo. Por serem as condições do SDS-PAGE parcialmente desnaturantes, não podem ser descartadas a presença de duas ou mais unidades monoméricas unidas nas bandas que apresentam atividade sintética, ou a presença de agregados proteicos com atividade sintética (TAPIZQUENT et al., 2017). Contudo, o zimograma atendeu ao objetivo de identificar potencial atividade específica para os substratos estudados. Os produtos de reação formam precipitados brancos sobre as bandas enzimáticas, que se mostraram insolúveis em tampões fosfato de sódio e tampões Tris-HCl, e também na metodologia de extração por clorofórmio-metanol proposta por Folch e colaboradores (FOLCH; LEES; SLOANE STANLEY, 1957). Estes produtos também se mostraram resistentes à sonicação, indicando que o material não apenas adsorveu à malha, mas foi sintetizado em meio à trama de poliacrilamida. Isto, somado ao fato de que não há fotodocumentadores de gel capazes de captar a coloração branca do precipitado, tornam a prospecção por zimografia bem interessante do ponto de vista qualitativo e de boa aplicabilidade em estudos preliminares de prospecção. Kwon e colaboradores (2011) identificaram a atividade de esterificação de uma lipase B recombinante de *Candida antarctica* por meio de zimogramas incubados em meios reacionais aquosos contendo apenas 1,5% dos ácidos graxos de interesse. A detecção da atividade também foi identificada a partir da formação de precipitados brancos nas malhas dos géis.

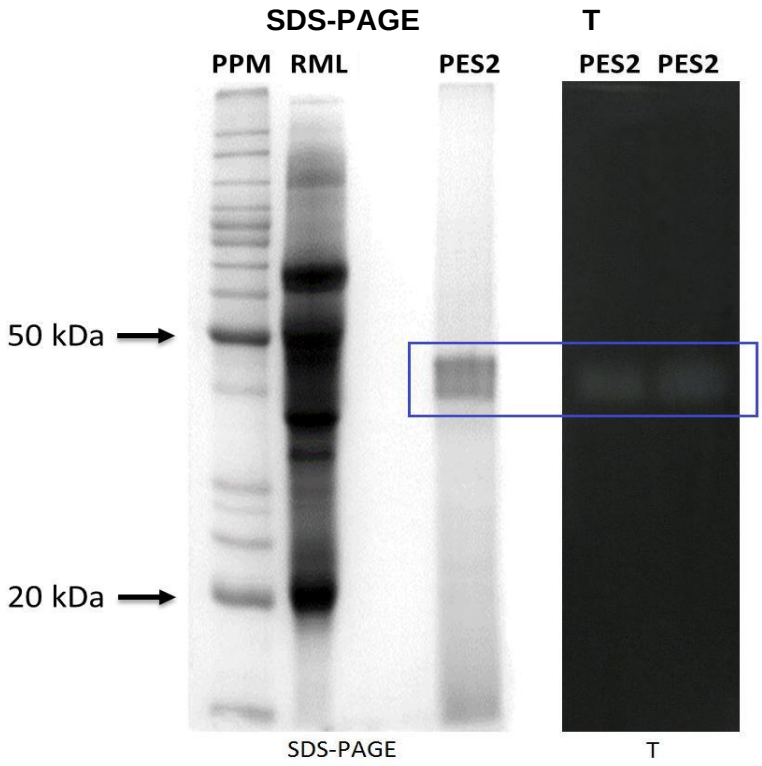


Figura 21: Gel de SDS-PAGE e zimograma para a reação de transesterificação entre o biodiesel de soja e o NPG. PPM: Marcador de Massa Molecular; RML: lipase comercial solúvel de *R. miehei* (SIGMA, L4277)); PES2: PES de *R. miehei* cultivado em torta de babaçu. T: gel submetido à reação de transesterificação, contendo 10μg/raia de proteínas totais do extrato bruto do PES de *R. miehei* cultivado em torta de babaçu, em duplicata, mostrando atividade na altura da banda observada no gel corado (retângulo azul).

Os resultados indicaram que o PES de *R. miehei* obtido a partir do cultivo em torta de babaçu apresenta promissor potencial como biocatalisador para a produção de biolubrificantes.

Outros zimogramas foram realizados com outras lipases comerciais de enzimas e outros poliálcoois, ácidos graxos e biodieseis como substratos, mostraram-se positivos, contudo, priorizou-se investigar aquele cujo produto foi apresentado no menor tempo de incubação, cerca de 30 h. O desenvolvimento desta metodologia gerou uma publicação em primeira autoria presente na seção APÊNDICE desta tese.

5.3. SÍNTESE DE BIOLUBRIFICANTE POR TRANSESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA A PARTIR DE BIODIESEL DE SOJA E NEOPENTILGLICOL UTILIZANDO PES

5.3.1. Preliminar

Preliminarmente, as seguintes matérias-primas foram estudadas para produção de biolubrificante: ácidos graxos de soja ou de mamona, biodiesel de soja ou de mamona, e os poliálcoois NPG, PET e TMP. Estas reações foram desenvolvidos em paralelo, com colaboração de parte do grupo de pesquisa, culminando em depósito de patente no Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) em 2017, relacionada ao processo para produção de ésteres e biolubrificantes catalisados por sólidos fermentados (GUERRA et al., 2017), presente na Seção APÊNDICE deste trabalho. Os ensaios preliminares foram realizados com enzimas comerciais em escala de bancada e por meio zimogramas, como forma de prospectar quais substratos e enzimas pareciam mais promissores (não mostrado). Dentre eles, destacaram-se os resultados da enzima de *R. miehei* nos biodieseis de mamona e soja e o poliálcool NPG, com os quais seguiram-se as reações de bancada com o PES descritas ao longo desta seção.

Apesar de o biodiesel já ser um produto manufaturado, dependendo de etapas anteriores de síntese, o mesmo é amplamente produzido no Brasil, e utilizá-lo como matéria-prima agrega algumas vantagens ao processo, como a maior garantia de pureza (BELKISE DE FREITAS MOREIRA, 2017). Além disso, dado o efeito inibitório do glicerol sobre a transesterificação, o uso de biodiesel elimina a necessidade de recuperação do glicerol (CHEN et al., 2019; RAO et al., 2018).

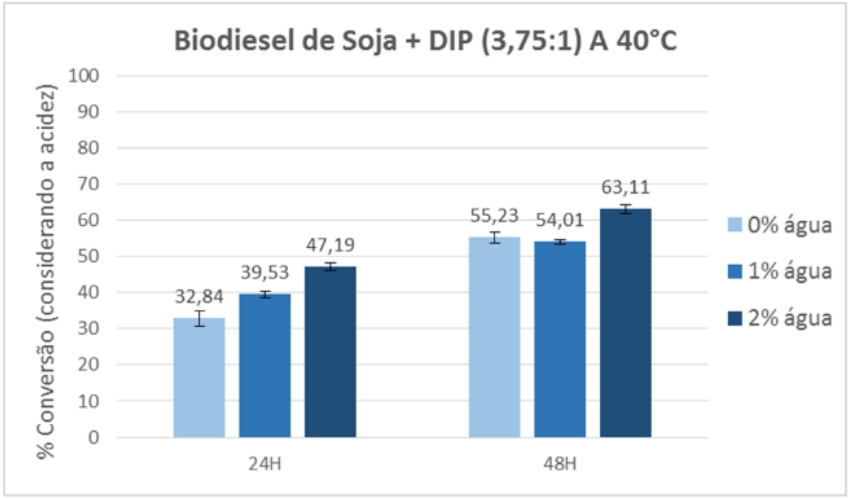
Com o objetivo de realizar uma análise preliminar do comportamento do PES como biocatalisador das reações de transesterificação entre o biodiesel de soja e o neopentilglicol (NPG), foram conduzidas reações de 48 h variando-se a temperatura (40 °C ou 50 °C) e o teor de água do meio reacional (0%, 1% ou 2% m/m). A razão molar inicial de biodiesel/poliálcool foi de 3,75:1.

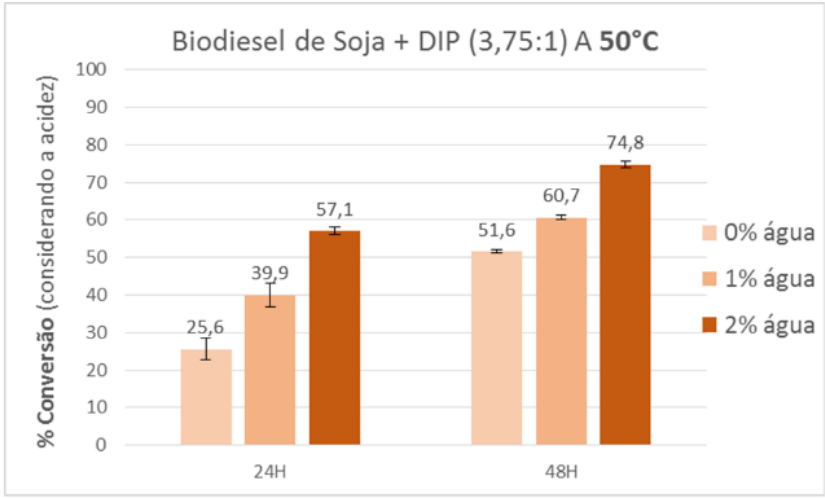
A literatura define a faixa entre 30 °C e 55 °C como a faixa ideal para sínteses por lipases (SZCZĘSNA ANTCZAK et al., 2009; TRENTIN et al., 2015). Os numerosos trabalhos de síntese por lipases desenvolvidos pelo do grupo do laboratório de pesquisa que obtiveram melhores resultados com a enzima de *R. miehei* em temperaturas de 40 °C ou 50 °C (AGUIEIRAS, 2015; AGUIEIRAS et al., 2014, 2019, 2020; SILVA, 2014). Estes resultados

foram determinantes para a escolha das temperaturas dos primeiros ensaios, aqui chamados ensaios preliminares.

Os resultados podem ser observados na Figura 22. Por meio da análise de variâncias por ANOVA, foi possível observar a influência estatisticamente significativa do teor de água na conversão obtida tanto em 24 h quanto em 48 h (Tabela 4, em vermelho). A influência resultante da interação entre o teor de água e a temperatura para o tempo de 24 h de reação também se mostrou estatisticamente significativo (tabela 4, destacado em vermelho). Todavia, apesar de os resultados a 50 °C mostrarem maiores conversões um maior percentual de acidez e (Figura 22), a diferença entre os resultados de conversão obtidos a 40 ºC e a 50 ºC não se mostrou estatisticamente significativa.

A 40 ºC, o mesmo inicia a reação em estado sólido e vai sendo solubilizado ao longo da reação. Já a 50 °C o poliálcool está solúvel desde o início da reação, o que poderia levar ao aumento da produtividade da reação devido à maior disponibilidade do substrato, resultando também em maior produção de ácidos graxos. A temperatura também pode ter influência na atividade da enzima para estes substratos. É sabido que o PES de *R. miehei* em torta de babaçu mantém boa atividade catalítica a 50 ºC (AGUIEIRAS; CAVALCANTI-OLIVEIRA; FREIRE, 2015). Por esta razão, para todas as reações a solubilização de água, álcool e biodiesel foi previamente obtida mantendo-se os substratos a 55 °C por 20 minutos. Em seguida, a temperatura era ajustada para a condição reacional desejada e era adicionado o PES.





ANOVA	
Em 24h:	Em 48h:
Temperatura	Temperatura
Teor de água	Teor de água
Interação Temperatura e água	Interação Temperatura e água

Figura 22: Comparação entre o Percentual de Síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de soja e NPG a 40 °C e a 50 °C catalisada pelo PES de torta de babaçu, e tabela ilustrativa resultante da ANOVA. As reações foram conduzidas com razão molar biodiesel/NPG de 3,75:1, concentração de PES 20% (m/m dos substratos), concentração de água 0%, 1 ou 2% (m/m dos substratos), a 40 °C ou 50 °C, em reator de leito agitado, por 48 h. O percentual de acidez já foi descontado dos percentuais de conversão mostrados. Na tabela, destaca-se em vermelho as variáveis ou as interações que apresentaram significância estatística (95% de confiança), detalhadas na tabela 4.

Tabela 4: ANOVA resultante da comparação do percentual de conversão a 40 °C e a 50 °C com diferentes teores de água. Em vermelho, observa-se as variáveis ou interações entre variáveis cuja variância resultante teve significância estatística (para 95% de confiança).

ANOVA	48h de reação					
Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Temperatura	59,6700451	1	59,67005	1,355491	0,259520278	4,413873
Teor de água	1414,345725	2	707,1729	16,06446	0,00009923	3,554557
Interações	137,6432747	2	68,82164	1,563383	0,236567624	3,554557
Dentro	792,3774203	18	44,02097			
Total	2404,036465	23				

ANOVA	24h de reação					
Fonte da variação	*SQ*	*gl*	*MQ*	*F*	*valor-P*	*F crítico*
Temperatura	6,172727806	1	6,172728	0,366744	0,552344626	4,413873
Teor de água	2107,959531	2	1053,98	62,62073	0,00000000781	3,554557
Interações	295,847538	2	147,9238	8,788683	0,002172143	3,554557
Dentro	302,9609728	18	16,83117			
Total	2712,94077	23				

Além da temperatura, a água constitui um fator importante para a reação. Ela pode catalisar as reações de hidrólise dos ésteres metílicos, que podem então ser esterificados com o poliálcool; contudo, ela também poderia, a princípio, favorecer a hidrólise dos poliol ésteres, ou ainda, retardar a transesterificação por favorecer a atividade hidrolítica da enzima. Em contrapartida, os resultados de acidez mostrados na Figura 23 indicam que o teor de acidez, a 50 °C, diminui com a adição de água. Estes resultados indicaram a complexidade da influência exercida pelos dois fatores reacionais mencionados, e foram melhor investigados por meio de metodologia de planejamento experimental na seção seguinte. Ensaios comparativos utilizando biodiesel de mamona também foram realizados seguindo as mesmas proporções e condições reacionais a 50 °C. Na Figura 24 estão os resultados de conversão de hidroxilas, e sua comparação com os resultados obtidos com o biodiesel de soja como matéria-prima. O PES apresentou bons resultados de conversão (atingindo até 64,54% de conversão) com o biodiesel de mamona, ainda que menores do que o máximo obtido com o biodiesel de soja (74,8%). Os ensaios com a matéria-prima oriunda da mamona foram realizados em paralelo e incluídos na patente, tendo sido escolhido o biodiesel de soja para os ensaios subsequentes. Esta opção vai além da maior conversão apresentada com o biodiesel de soja; há uma maior segurança relacionada à disponibilidade desta matéria-prima, uma vez que a produção de biodiesel brasileira é majoritariamente advinda da soja (Fig. 12). Já a produção de biodiesel de mamona cessou em todo país desde 2017 (ANP, 2019). O uso de biodiesel de mamona para síntese comercial de biolubrificantes depende, dessa forma, de incentivos à produção desta matéria-prima.

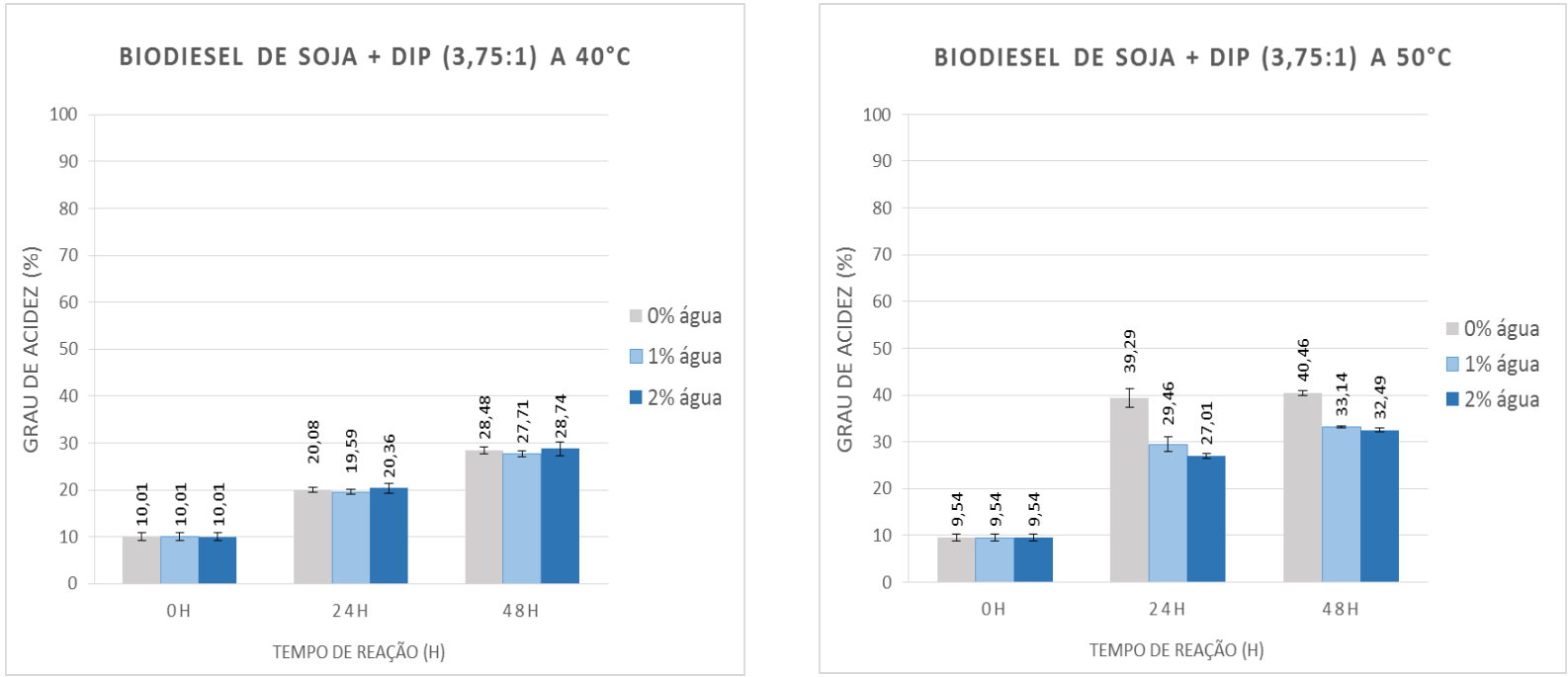


Figura 23: Teor de acidez ao longo da reação de síntese de biolubrificante a partir de biodiesel de soja e NPG catalisada pelo PES de torta de babaçu a 40 °C (à esquerda) e à 50 °C (à direita). As reações foram conduzidas com razão molar biodiesel/NPG de 3,75:1, concentração de PES 20% (m/m dos substratos), concentração de água 0%, 1 ou 2% (m/m dos substratos), a 40 °C ou 50 °C, em reator de leito agitado, por 48 h.

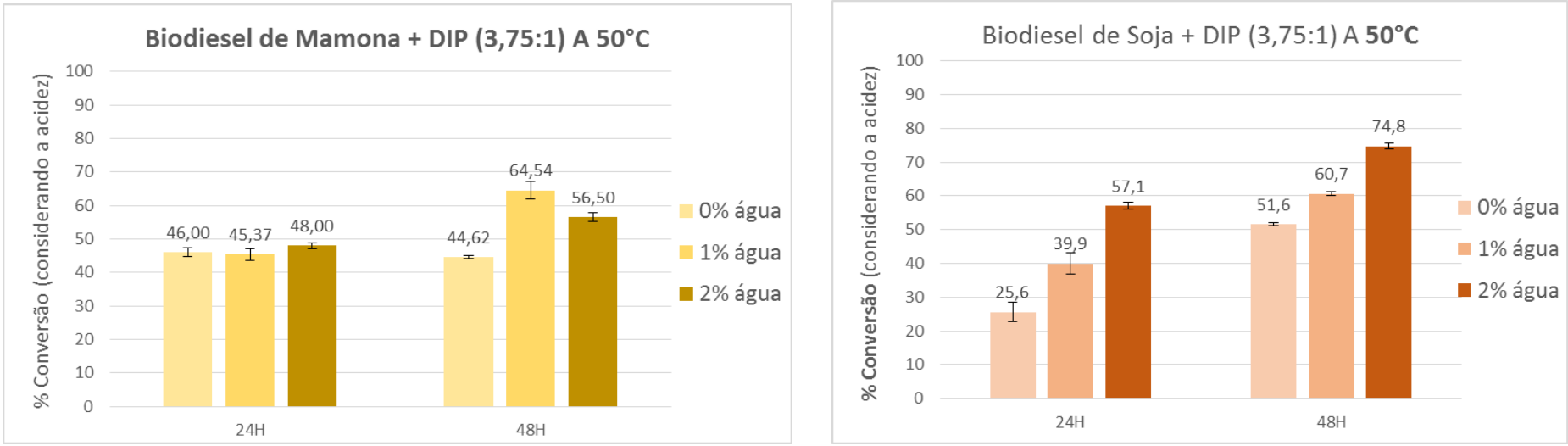


Figura 24: Comparação entre o Percentual de Síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de mamona e NPG (à esquerda) e biodiesel de soja e NPG (à direita) a 50 °C catalisada pelo PES de torta de babaçu. As reações foram conduzidas com razão molar biodiesel/NPG de 3,75:1, concentração de PES 20% (m/m dos substratos), concentração de água 0%, 1 ou 2% (m/m dos substratos), a 50 °C, em reator de leito agitado, por 48 h. O percentual de acidez já foi descontado dos percentuais de conversão mostrados.

5.3.2 Estudo da influência de variáveis reacionais na produção do biolubrificante por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para otimização do processo

A metodologia de planejamento experimental composto rotacional (DCCR) ofereceu dados importantes acerca dos parâmetros que podem modificar a produtividade da síntese de biolubrificante a partir de biodiesel de soja e neopentilglicol, usando o PES de *R. miehei*. Os 17 ensaios e seus respectivos resultados de conversão e acidez foram medidos nos intervalos de 8 h, 24 h e 48 h e organizados na Tabela 5. As duas melhores condições apresentaram conversões similares: a condição na qual biodiesel de soja e NPG estão em razão 2:1 e 2,5% de água (85,5% ±1 de conversão – ensaio 11) e a condição na qual biodiesel de soja e NPG estão em razão 3,1:1 e 2,5% de água (84,2% ±6 de conversão – ensaio 17, representativo da triplicata de ensaios 15 a 17), ambas a 45 °C. A primeira condição, que apresenta biodiesel e poliálcool em razão estequiométrica, apresentou o menor percentual de acidez (11%) do que a segunda (11% contra 27%), onde há excesso de biodiesel em relação ao poliálcool. Ambos os resultados foram organizados na forma gráfica comparativa vista na Figura 32, para fins ilustrativos.

Na Tabela 6 estão mostrados os efeitos padronizados das variáveis (valores de t) e a probabilidade de significância do teste (valor de p) para todas as variáveis. Observou-se que os efeitos quadráticos da temperatura, do teor de água e da razão molar, bem como o efeito linear desta última, foram estatisticamente significativos. Os demais efeitos não foram significativos também quando observados os efeitos e 24 h e 48 h (dados não mostrados). Por esta razão, as demais variáveis foram removidas da análise de variâncias, sendo incorporados aos resíduos para o cálculo da análise de variância e os efeitos considerados são mostrados para os tempos de 8 h, 24 h e 48 h na Tabela 7. Os Gráficos de Pareto dos três tempos analisados foram colocados nas Figuras 25, 26 e 27 para melhor visualização da relevância dos efeitos. O termo quadrático da água apresentou o efeito mais significativo, mantendo-se relevante por todas as 48 h de reação. Já a temperatura perde relevância ao longo dos tempos analisados, até perder significância em 48 h. A razão molar perde sua relevância a partir das 24 h de reação.

A análise de variâncias (ANOVA) desta configuração retornou que a percentagem de variação explicada pelo modelo (R^2) foi de 90,4% para as conversões obtidas em 8 h, com um F calculado para a regressão altamente significativo (11 vezes maior do que o valor crítico de F); em 24 h, o R^2 foi de 83%, apresentando F calculado cerca de 4 vezes maior do que o valor crítico de F. Para os resultados após 24 h, o R^2 foi de 79,99%, com F calculado 6 vezes maior do que o valor crítico de F (Tabela 8). Os altos valores de R^2, aliados aos altos valores de F_{calc},

mostram que o modelo se ajusta bem aos dados experimentais.

A análise de variância permitiu a construção das curvas de contorno apresentadas nas Figuras 28 e 29, em que é possível verificar que os melhores resultados de síntese ocorreram nas condições que correspondem aos níveis mais centrais do estudo proposto. Em 8 h, a maior conversão foi atingida com as razões molares 3,1:1 e 3,75:1 (níveis 0 e +1) e com a temperatura de 45°C. Já em 24 h, a conversão máxima pode ser atingida a partir da razão molar 2,45:1, a razão com menor excesso de biodiesel (nível -1), mantendo-se máxima até a razão 3,75:1. Ao final das 48 h, entretanto, a conversão máxima foi atingida somente na razão molar central (nível 0), que é de 3,1:1. Tanto a razão molar estequiométrica quanto a razão molar com maior excesso de biodiesel apresentaram menores percentuais de conversão relativos.

A perda de influência da razão molar pode estar relacionada com o fato de que a faixa de razões molares utilizadas garantiu o equilíbrio favorável à formação de ésteres de neopentilglicol. Ainda que a mínima razão utilizada tenha sido a exata razão estequiométrica (2 mols de BDS para 1 mol de NPG), a perda através dos reatores de metanol formado contribui para favorecer a síntese.

Quanto à possibilidade de investigar condições reacionais que empreguem o excesso de neopentilglicol, a literatura aponta que o excesso de poliol ésteres resulta em maior perda de atividade enzimática (CHEN et al., 2008; WATANABE et al., 2007), fenômeno atribuído à perda do potencial de reutilização em lipase comercial de *C. antarctica* (ÅKERMAN et al., 2011). Por essas razões, as variações de razão molar estudadas, não contemplaram o comportamento reacional frente a uma condição com excesso de neopentilglicol.

Tabela 5: Resultados obtidos com as reações para o DCCR com seus respectivos resultados de conversão de hidroxilas e de acidez.

	Variáveis			% Conversão			% Acidez		
Ensaios	H_2O	Razão Molar	Temperatura	8h	24h	48h	8h	24h	48h
1	1,0	2,45	40	17,5	33,7	53,6	22,2	27,4	23,3
2	4,0	2,45	40	16,6	37,0	58,0	23,0	32,4	23,1
3	1,0	3,75	40	25,8	48,0	59,7	22,1	28,3	30,0
4	4,0	3,75	40	18,8	43,7	66,6	32,5	33,5	30,9
5	1,0	2,45	50	18,0	41,0	58,3	20,3	23,9	25,4
6	4,0	2,45	50	16,7	39,1	58,7	27,5	28,5	28,4
7	1,0	3,75	50	27,3	55,5	67,1	21,1	29,3	32,1
8	4,0	3,75	50	23,1	48,2	65,5	26,9	28,4	36,5
9	0,0	3,1	45	16,7	36,4	46,6	16,9	23,5	30,8
10	5,0	3,1	45	17,8	30,4	44,8	28,0	34,6	34,4
11	2,5	2,0	45	31,4	59,7	85,5	19,9	14,7	11,0
12	2,5	4,2	45	40,5	65,4	71,6	22,6	27,4	34,4
13	2,5	3,1	36,6	29,0	62,0	85,7	21,9	20,6	23,6
14	2,5	3,1	53,4	19,7	19,2	63,9	27,3	28,8	30,5
15	2,5	3,1	45	48,8	70,0	87,7	16,4	24,2	30,7
16	2,5	3,1	45	44,8	63,9	78,5	19,8	24,3	29,2
17	2,5	3,1	45	40,2	67,6	86,4	20,8	20,7	27,1

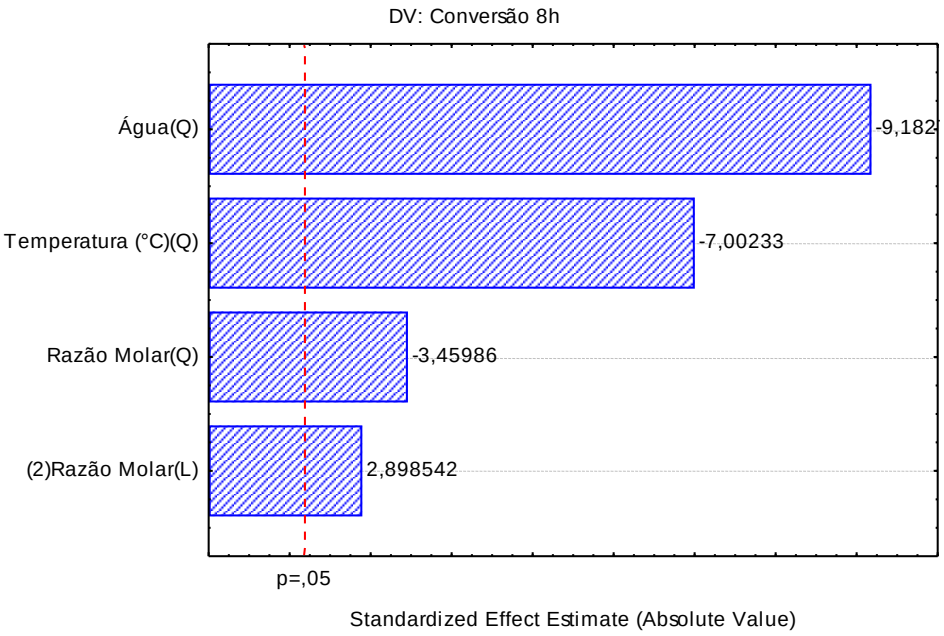


Figura 25: Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores na conversão em 8 h de reação entre o biodiesel de soja e o NPG.

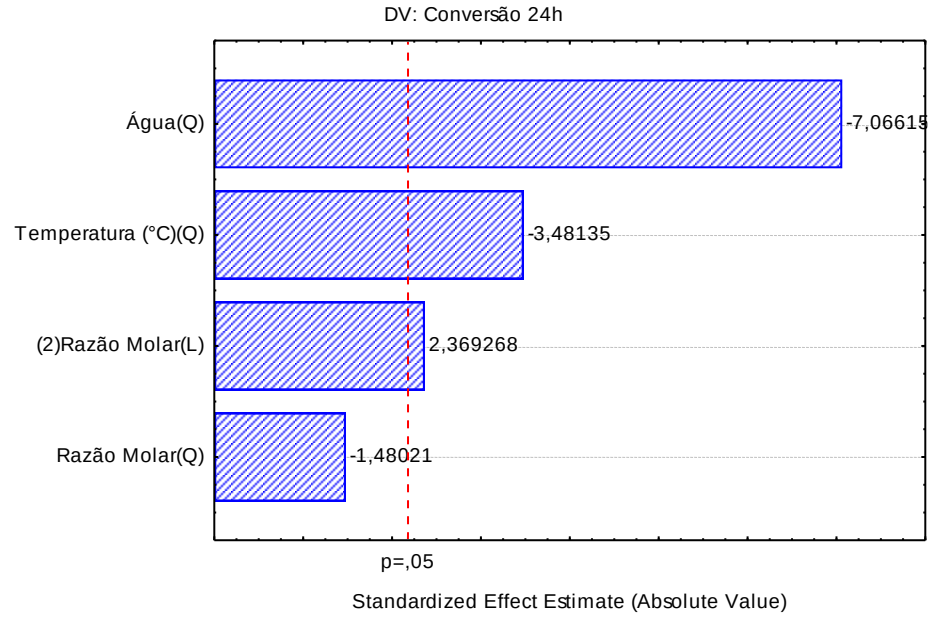


Figura 26: Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores na conversão em 24 h de reação entre o biodiesel de soja e o NPG.

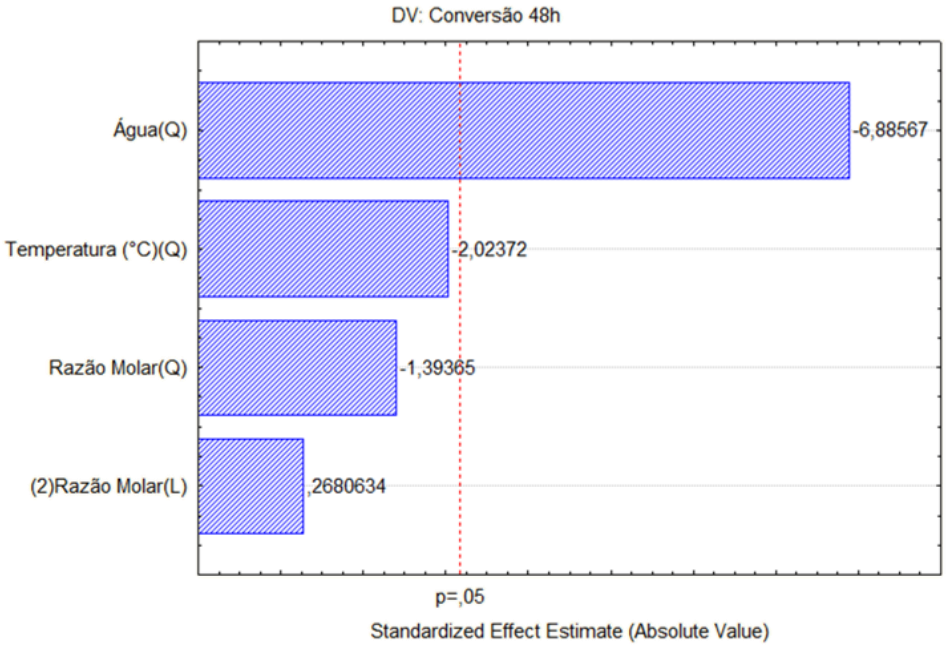


Figura 27: Diagrama de Pareto para os efeitos dos fatores na conversão em 48 h de reação entre o biodiesel de soja e o NPG.

Tabela 6: Efeitos das variáveis independentes lineares (L) e quadráticas (Q) sobre a conversão nos diferentes tempos de reação (8 h). Estão destacadas em cinza as variáveis com efeitos considerados estatisticamente significativos (p<0,05).

Conversão em 8 h				
	Efeito	erro padrão	t (7)	p
Factor				
Média	44,8752	2,669051	16,81317	0,000001
Água (L)	-1,6963	2,508284	-0,67628	0,520575
Água (Q)	-21,2618	2,763320	-7,69429	0,000117
Razão Molar(L)	6,0919	2,508284	2,42871	0,045506
Razão Molar(Q)	-8,0110	2,763320	-2,89904	0,023017
Temperatura (°C)(L)	-1,3518	2,508284	-0,53893	0,606643
Temperatura (°C)(Q)	-16,2133	2,763320	-5,86731	0,000620
1L by 2L	-2,2807	3,275784	-0,69622	0,508742
1L by 3L	0,6132	3,275784	0,18718	0,856830
2L by 3L	1,3002	3,275784	0,39692	0,703250

Tabela 7: Efeitos das variáveis independentes lineares (L) e quadráticas (Q) sobre a conversão nos diferentes tempos de reação (8 h, 24 h e 48 h). Estão destacadas em cinza as variáveis com efeitos considerados estatisticamente significativos ($p<0,05$).

Conversão em 8 h				
	Efeito	erro padrão	t (12)	p
Média	44,8752	2,236421	20,06563	0,00
Água (Q)	-21,2618	2,315411	-9,18273	0,000001
Razão Molar (L)	6,0919	2,101714	2,89854	0,013362
Razão Molar (Q)	-8,011	2,315411	-3,45986	0,004718
Temperatura (°C) (Q)	-16,2133	2,315411	-7,00233	0,000014
Conversão em 48 h				
	Efeito	erro padrão	t (12)	p
Média	28,92592	1,031993	28,02917	0,00127
Água (Q)	3,14552	1,068443	2,94403	0,098606
Razão Molar (L)	10,07057	0,969833	10,38382	0,009147
Razão Molar (Q)	-3,87265	1,068443	-3,62457	0,0684
Temperatura (°C) (Q)	-0,78424	1,068443	-0,73401	0,539332
Conversão em 24 h				
	Efeito	erro padrão	t (12)	p
Média	67,4731	3,569731	18,90144	0,00
Água (Q)	-26,1152	3,695812	-7,06615	0,000013
Razão Molar (L)	7,9482	3,354713	2,36927	0,035449
Razão Molar (Q)	-5,4706	3,695812	-1,48021	0,164588
Temperatura (°C) (Q)	-12,8664	3,695812	-3,48135	0,004535

Tabela 8: Efeitos do DCCR para a resposta conversão nos diferentes tempos de reação (8 h, 24 h e 48 h) por ANOVA. Valor de F = média quadrática da regressão/média quadrática do resíduo.

	8 h					
95% de Confiança	Soma Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das Médias	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	1739,631	4	434,908	36,21	3,26	1,31E-06
Resíduos	144,146	12	12,012			
Falta de ajuste	144,146	10				
Erro puro	36,670	2				
TOTAL	1883,777	16				
Coeficiente de determinação: R^2 = 0,90401						
	24 h					
95% de Confiança	Soma Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das Médias	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	2271,007	4	567,752	15,42	3,26	0,000113
Resíduos	441,941	12	36,828			
Falta de ajuste	441,941	10				
Erro puro	18,739	2				
TOTAL	2712,948	16				
Coeficiente de determinação: R^2 = 0,83019						
	48 h					
95% de Confiança	Soma Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado das Médias	F calculado	F tabelado	p-valor
Regressão	2470,503	3	823,501	19,06	3,26	0,000048
Resíduos	561,701	13	43,208			
Falta de ajuste	561,701	11				
Erro puro	48,919	2				
TOTAL	3032,204	16				
Coeficiente de determinação: R^2 = 0,79982						

A temperatura é um parâmetro muito importante para a manutenção da atividade enzimática. Reações conduzidas em temperaturas elevadas podem levar a desnaturação enzimática, culminando na perda de atividade catalítica e consequente queda do rendimento reacional (FOGLER et al., 2014). O modelo prevê que os extremos de temperatura influenciariam negativamente na síntese, apesar de ainda apresentarem boas faixas de conversão. Na Figura 29, vê-se a superfície de resposta e a curva de contorno geradas para a razão molar 3,1:1 (razão na qual foram previstos os melhores resultados de conversão com o

mínimo excesso de biodiesel) em função das variáveis água, razão molar e temperatura para 48 h de reação, reproduzindo a observação de que o melhores percentuais de síntese ocorrem nas condições centrais de temperatura e teor de água.

Nos resultados obtidos pela análise dos efeitos, nenhuma das temperaturas testadas pareceu ter influência significativa direta nas conversões resultantes. Este resultado pode ser interpretado como positivo quando pensado em seu impacto em um bioprocesso industrial, uma vez implica na possibilidade de trabalhar em uma faixa mais ampla de temperatura, e permite que controles rígidos de temperatura sejam desconsiderados.

Por outro lado, os resultados apontam que temperaturas mais altas tendem a ter maiores teores de ácidos graxos (Tabela 5 e figura 30). Desta maneira, a temperatura também pode ser pensada como uma fonte de controle da acidez reacional. Em trabalho realizado por Andrade e colaboradores (2017) a redução de temperatura de 50 °C para 35 °C na transesterificação entre óleo de mamona e metanol utilizando solução líquida comercial da enzima de *A. oryzae* **(**Eversa Transform) reduziu a formação de ácidos graxos, apesar de reduzir também o rendimento reacional, concordando os resultados de acidez obtidos neste trabalho. Esta variação de rendimento e de ácidos graxos dependente de temperatura gera produtos com proporções variadas entre os ésteres da matéria-prima e os sintetizados a partir dela. Estudos que avaliam o que esta variação de ajustes de temperatura modifica nas características físico-químicas dos produtos gerados poderiam ser utilizados para a tomada de decisões quanto às preferências de ajuste de temperatura em um bioprocesso, equilibrando a natureza do produto desejado com os efeitos na desnaturação enzimática.

Levando em conta o equilíbrio entre a formação de ácidos graxos e o rendimento reacional, a condição reacional 13, da Tabela 5, não foi escolhida para prosseguir com os estudos. Apesar de a reação conduzida a 36,6 °C apresentar 85% de conversão em 48 h, considerou-se que esta condição, apesar de produzir menos ácidos graxos, teria menor probabilidade de atingir rendimentos maiores por conta da baixa temperatura em relação às temperaturas empregadas nos resultados da literatura mais promissores aqui citados.

A Figura 30 representa a superfície gerada para a razão molar central, evidenciando que temperaturas mais altas favorecem o aumento da formação de acidez, mas seu efeito é mais relevante quando o maior percentual de água (5%, nível +1,68) é adicionado. Apesar da previsão de formação de ácidos graxos na ausência de água, é possível que esta ocorra iniciada por água residual presente na enzima ou no biodiesel. Já o maior percentual de água, por outro lado, pode resultar no aumento da acidez em decorrência do favorecimento do equilíbrio

reacional em direção à hidrólise e não à esterificação/transesterificação. A partir desta condição de razão molar, a previsão de geração de acidez permaneceu a mesma para as razões molares superiores (níveis +1 e +1,68).

Ensaios realizados em bancada com a condição 9 (razão molar de 3,1:1, 45°C e 0% de água) atingiram 60% de conversão de hidroxilas em 72 h de reação, e mantiveram esta conversão até 120 h (dados não mostrados), indicando que a ausência completa de água, considerando as outras faixas de condições utilizadas, não favoreceu a síntese de neopentilglicol ésteres.

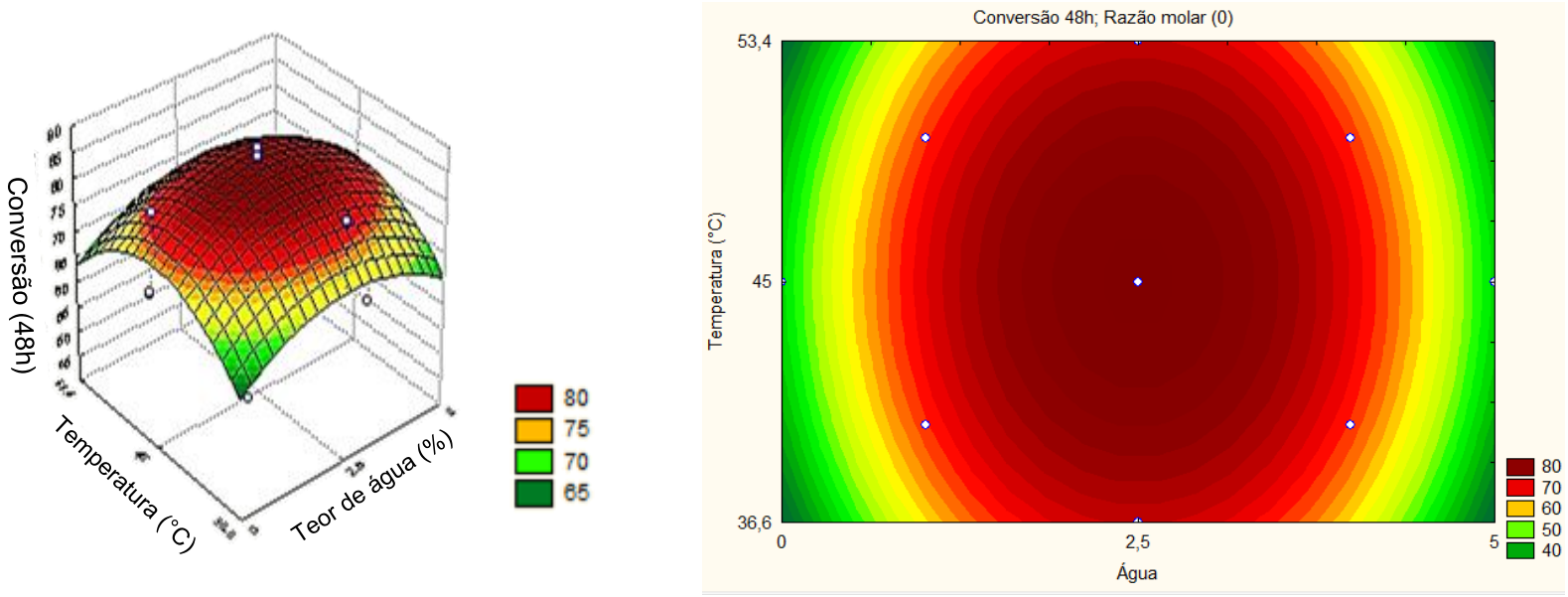


Figura 28: Superfície de resposta (a esquerda) e curva de contorno (a direita) para a conversão em 48 h como função da temperatura e do teor de água.

A legenda em cores indica a conversão percentual para cada temperatura e teor de água, referentes à razão molar de 3,1:1 (biodiesel:NPG).

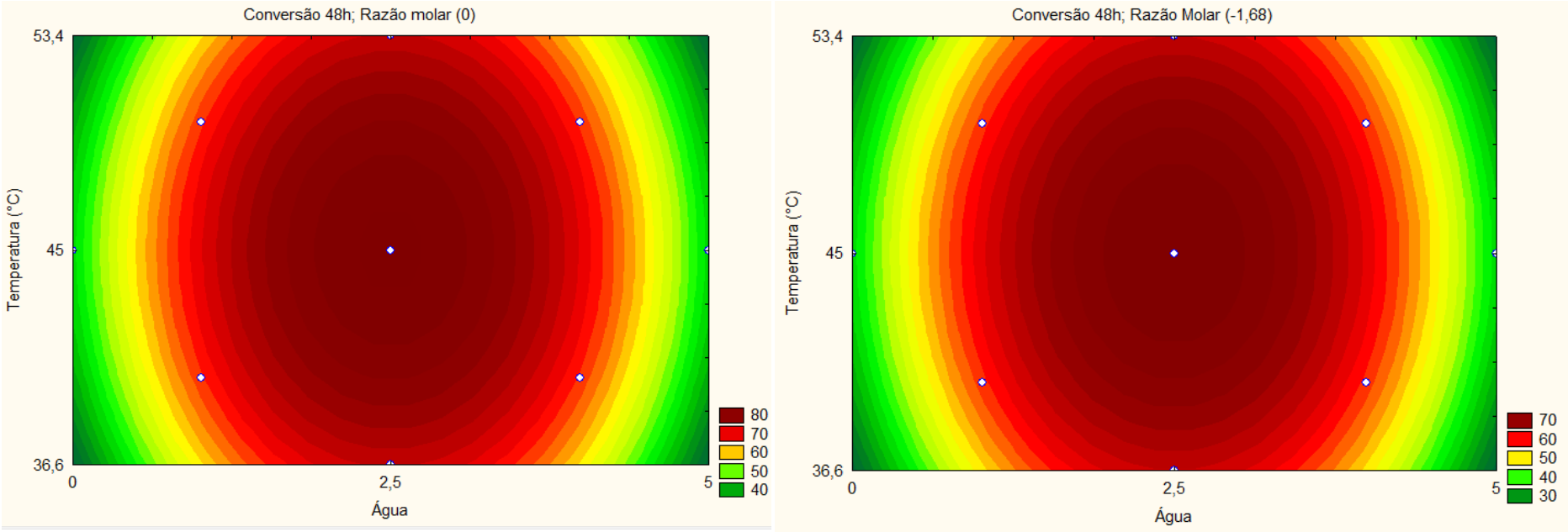


Figura 29: Representação gráfica das curvas de contorno para os dados de conversão a partir do método de Delineamento Composto Central Rotacional em 48 h. A legenda em cores indica a conversão percentual para cada temperatura e teor de água, referentes à razão molar de 3,1:1 (biodiesel:NPG) à esquerda, e à razão molar de 2:1 (biodiesel:NPG) à direita.

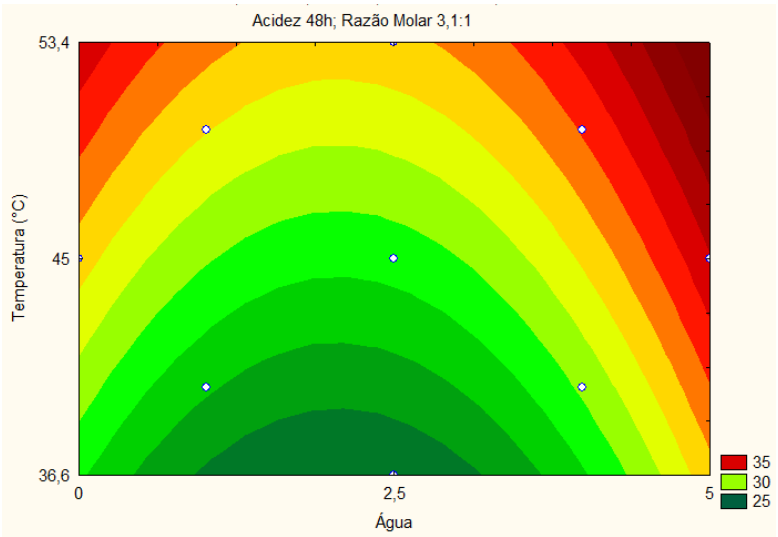


Figura 30: Representação gráfica do modelo de ajuste de superfície para os dados de acidez a partir do método de Delineamento Composto Central Rotacional em 48 h. A legenda em cores indica a acidez percentual para cada temperatura e teor de água, referentes à razão molar de melhor conversão (3,1:1).

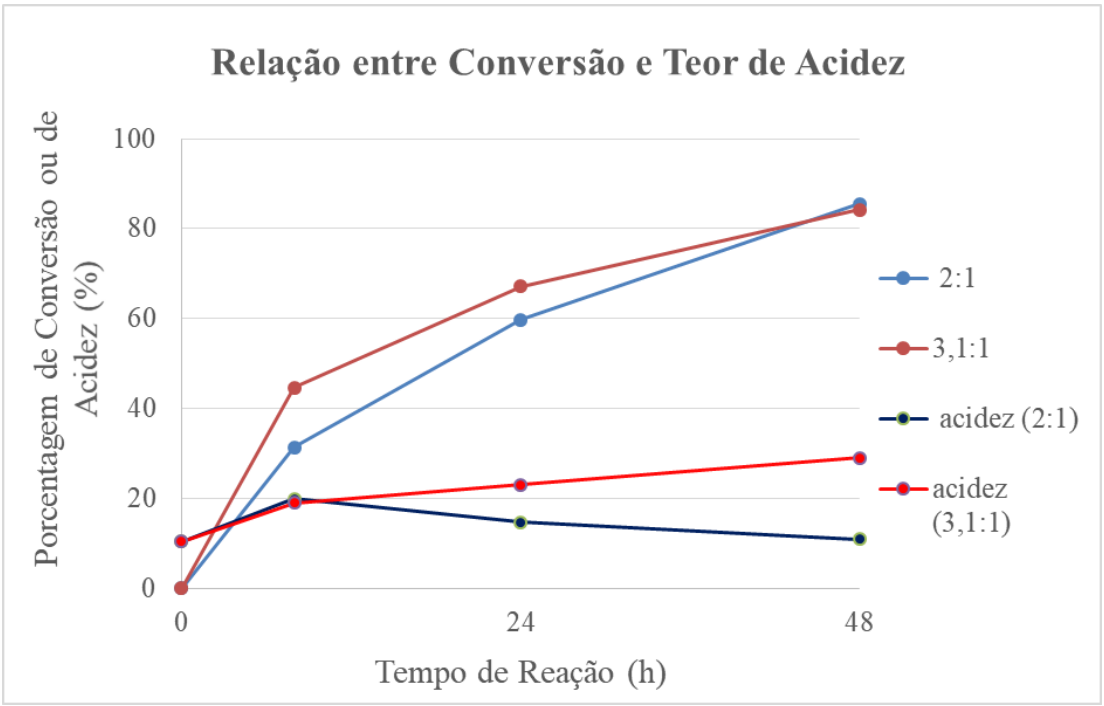


Figura 31: Curso reacional das condições 11 e 15 (ponto central) do DCCR, que apresentaram os melhores resultados de conversão, seguidas de seus respectivos percentuais de acidez. Vermelho – condição 15: razão molar 3,1:1 (BDS:NPG); Azul – condição 11: razão molar 2:1 (BDS:NPG). Ambas continham 2,5% de água e ocorreram a 45 °C por 48 h.

A presença de água das reações de transesterificação possui dois aspectos a serem considerados. O primeiro é o seu papel na formação das superfícies interfaciais necessárias à atuação das lipases. Como os rendimentos das reações de transesterificação dependem do tamanho da área interfacial, alguns estudos reportam que adição de pequenas quantidades de água no meio favorece as reações devido a maior formação das interfaces orgânico/aquosas requeridas para a atuação da enzima (CESARINI; DIAZ; NIELSEN, 2013; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; SALUM et al., 2010; WANG et al., 2010). Um segundo ponto que torna importante o estudo do teor de água reacional é inerente aos mecanismos de transesterificação. A transesterificação pode ocorrer com apenas uma etapa de reação, determinada alcoólise direta, ou por um processo em duas etapas consistindo em hidrólise e esterificação simultâneas (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2013a; CHEIRSILP; H-KITTIKUN; LIMKATANYU, 2008; HONARY; RICHTER, 2011; RODRIGUES et al., 2010; SHAH et al., 2016). Recentemente, Canet e colaboradores (2016) estudaram qual o mecanismo estava envolvido da transesterificação de trioleína ou óleo de oliva com metanol, realizando reações com adição de quantidades variadas de ácido oleico. Neste trabalho, o grupo conseguiu demonstrar que a transesterificação catalisada por lipases parece ser a combinação destes dois processos (CANET et al., 2016), complementando outros indícios anteriormente reportados (DU; WANG; LIU, 2007; WATANABE et al., 2005).

A influência da água em reações de alcoólise, hidrólise e esterificação enzimáticas é largamente discutida na literatura. As lipases apresentam diferentes tolerâncias a presença de água no meio reacional, contribuindo para a manutenção da estabilidade enzimática (DEREWENDA et al., 1992; GUPTA et al., 2015; VILLENEUVE, 2007), além de influenciar o equilíbrio reacional.

Utilizando lipases de *R. oryzae* e *A. oryzae* para estudo de reações de metanólise de monoglicerídeos (MG), diglicerídeos (DG) e triglicerídeos (TG) de ácido oleico, Hama e colaboradores (2009) estudaram concentrações entre 0% e 30 % de água. Os maiores teores de ésteres metílicos foram obtidos com 5% de água, quando estes ultrapassam os 95% da composição reacional após 24 h de síntese. Bons resultados também foram obtidos quando utilizados 10% de água, com 90% de rendimento de ésteres metílicos, enquanto as concentrações extremas (0% e 30%) apresentaram teores abaixo de 90%. Os autores consideraram a inativação das lipases na ausência de água como o fenômeno responsável pelo baixo rendimento nesta condição, enquanto 30% de água resultaria em um excesso que atuaria

como inibidor competitivo para a esterificação, e consequentemente um inibidor da metanólise (VALIVETY et al., 1991).

Dhawane et al. (2017) obtiveram o melhor rendimento na transesterificação enzimática entre óleo de soja refinado e metanol a 35 °C quando utilizaram 3% (m/m) de água, alcançando 97% de rendimento após 36 h de reação com a lipase comercial de *A. orizae* Eversa® imobilizada. Remonatto e col. (2016) também reportaram 97% de rendimento em ésteres metílicos utilizando 2,5% de água em reações entre óleo de cozinha usado e metanol para produção de biodiesel após 16 h de reação empregando a mesma enzima, desta vez em meio aquoso, acrescentando mais 1% de água além dos 2,5% adicionados ao meio reacional.

A manutenção da estabilidade na presença de teores não muito baixos de água permite a integração com sistemas de produção de bioetanol por fermentação. Adachi et al. (2013) foram bem-sucedidos ao desenvolver um bioprocesso que integra a etanólise de óleo de canola para produção de biodiesel com bioetanol obtido a partir de fermentação da biomassa de arroz marrom. O bioetanol passou por uma destilação simples, e os 5% água remanescentes em sua composição contribuíram para o aumento do conteúdo de ésteres etílicos em reações conduzidas por 90 h com a lipase recombinante de *Fusarium heterosporum.*

As porcentagens de água testadas na literatura podem variar bastante. Isto se torna ainda mais complexo quando se considera que os álcoois empregados apresentam diferentes solubilidades em água. Estudos com sistemas reacionais contendo solventes orgânicos demonstraram que, considerada a variação na solubilidade em água dos diferentes solventes e álcoois, o teor de água adicionado à reação não é necessariamente é o teor de água disponível para o biocatalisador (DUAN; CHEN, 1994; GOLDBERG et al., 1988; HALLING, 1989; ZAKS; KLIBANOV, 1988). Isto endossa a grande variedade de estudos existentes que consideram variar internamente o teor de água e demonstra a relevância de estudos que investiguem o teor de água adequado para cada combinação entre matérias-primas doadoras de ácidos graxos e álcoois receptores.

5.4. PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTE POR ENZIMA COMERCIAL RM-IM E PES

A metodologia de planejamento experimental composto rotacional (DCCR) ofereceu dados importantes acerca dos parâmetros que podem modificar o rendimento da produção de biolubrificante a partir de biodiesel de soja e neopentilglicol, usando o PES de *R. miehei* crescido em torta de babaçu. Os resultados reforçaram a importância de fatores como a razão

molar dos substratos e o teor de água no meio reacional, além da temperatura, na obtenção de maior quantidade de produtos e com menor teor de acidez.

As duas condições reacionais que atingiram melhor conversão no DCCR (plotadas no gráfico da Figura 31) foram reproduzidas em reações conduzidas por 120 h, com o objetivo de validar a reprodutibilidade dos resultados do DCCR e de observar a cinética reacional prolongada e seus efeitos na síntese e no teor de acidez. Alíquotas reacionais foram colhidas aos 10 minutos e ao fim da 1ª hora, e depois nos tempos de 24, 48, 72, 96 e 120 h. As amostras foram avaliadas quanto ao percentual de hidroxilas convertidas e quanto ao percentual de acidez. Os resultados demonstraram que as sínteses observadas no DCCR, além de reprodutíveis, alcançaram seus níveis máximos de conversão de hidroxilas em 72 h, chegando a 100% na condição com excesso de biodiesel e a 92% na condição estequiométrica (Figs. 32 e 33). Além disso, a síntese de ésteres de neopentilglicol por 120 h em ambas as condições atingiu seu ápice a partir de 72 h, mantendo o percentual de conversão constante a partir daí. Estes resultados indicam que é possível obter um produto ainda mais concentrado do que aquele resultante dos estudos dos parâmetros reacionais. Além disso, a não reversão da reação no sentido da hidrólise dos ésteres de neopentilglicol permite maior segurança durante um processo industrial.

Para investigar se o PES seria tão produtivo quanto uma enzima comercial, ensaios com ambas as enzimas em condições semelhantes e atividade enzimática equivalente foram conduzidos e explicitados nas Figuras 32 e 33. A enzima comercial de *R. miehei*, a Lipozyme RM-IM, apresentou resultados bem semelhantes aos das sínteses com PES, quanto à conversão de hidroxilas, exibindo resultados inferiores de acidez aos observados com o PES, especialmente na condição estequiométrica (Fig. 33). Um possível motivo para esta diferença está na diferença estrutural entre os biocatalisadores: Enquanto no catalisador obtido no LaBiM as enzimas fazem parte de um complexo formado por torta de babaçu, hifas e enzimas aderidas, o biocatalisador comercial consiste em um preparado enzimático de maior grau de pureza imobilizado em resina porosa de troca iônica. Assim, é possível que a dinâmica reacional seja alterada por estas diferentes configurações, resultando em diferentes taxas reacionais de alcoólise, esterificação e/ou hidrólise.

Apesar da conversão de 100%, a condição reacional de 3,1:1 (biodiesel:NPG) demonstrou que o acréscimo de 50% na matéria-prima, apesar de resultar em 8% mais conversão, apresentou teor de acidez três vezes superior ao do produto com 92% de conversão (Fig. 32). Sabe-se que a acidez é um fator bastante indesejado em um lubrificante, devido à sua influência

negativa na formação de depósitos. A formação de ácidos graxos sob aquecimento é um dos fatores que torna os óleos vegetais pouco aplicáveis como lubrificantes (DA SILVA, 2012; SHARMA; BIRESAW, 2017). A princípio, a reação com razão estequiométrica foi, portanto, priorizada. Por outro lado, a remoção de ácidos graxos pode ser feita por um processo denominado destilação molecular (MARTINS et al., 2006; WANG et al., 2010) e foi oferecida como etapa de especificação final do biolubrificante pelo CENPES, o que encorajou o prosseguimento dos experimentos com excesso na razão molar.

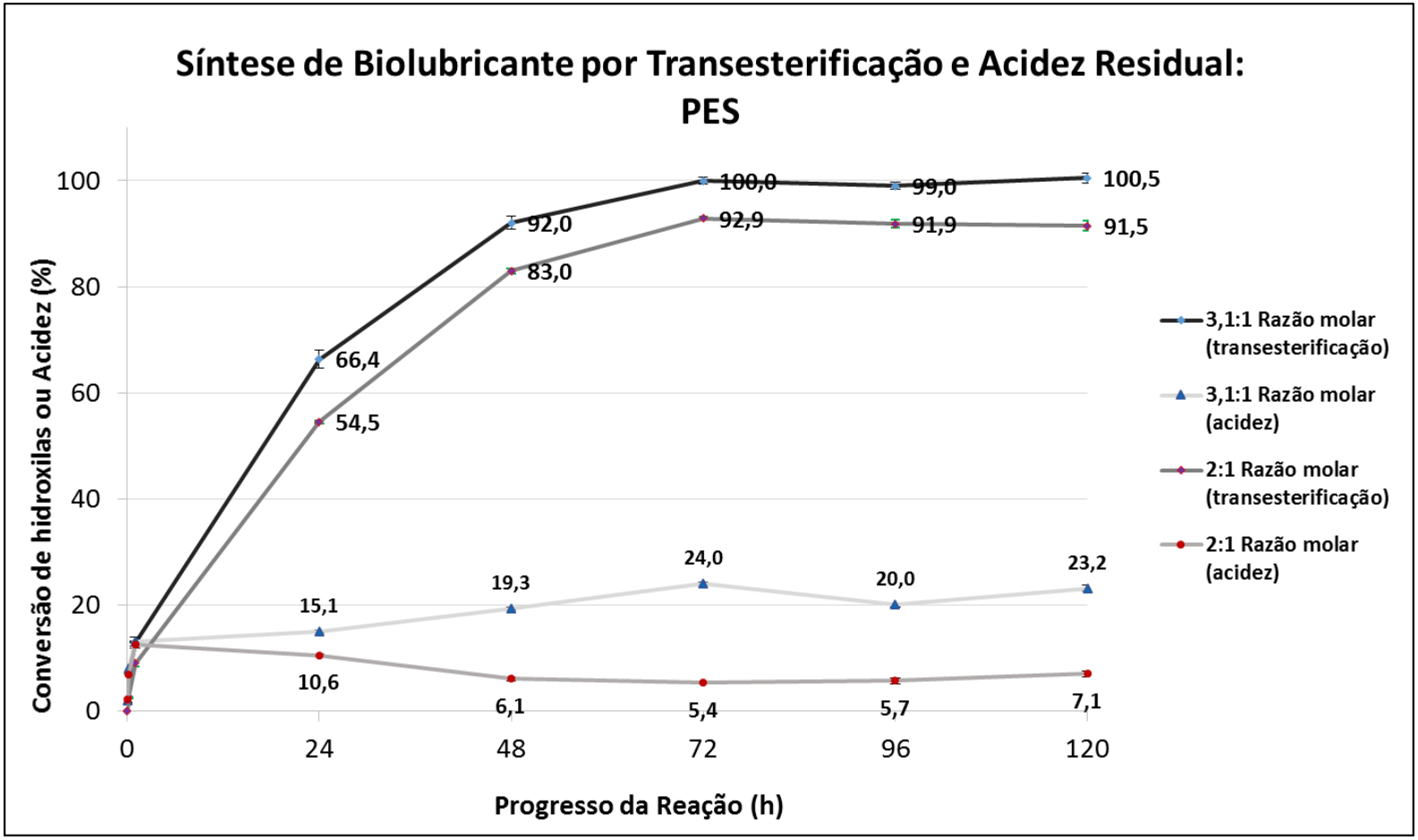


Figura 32: Cinética da síntese de biolubrificante catalisada pelo PES a partir de biodiesel de soja e NPG, em razão estequiométrica (2:1) ou com excesso de biodiesel (3,1:1), correlacionando o percentual de conversão de hidroxilas e o teor de acidez nas duas proporções de substrato avaliadas. As reações foram conduzidas por 120 h em batelada simples a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m) e 20% de PES (m/m).

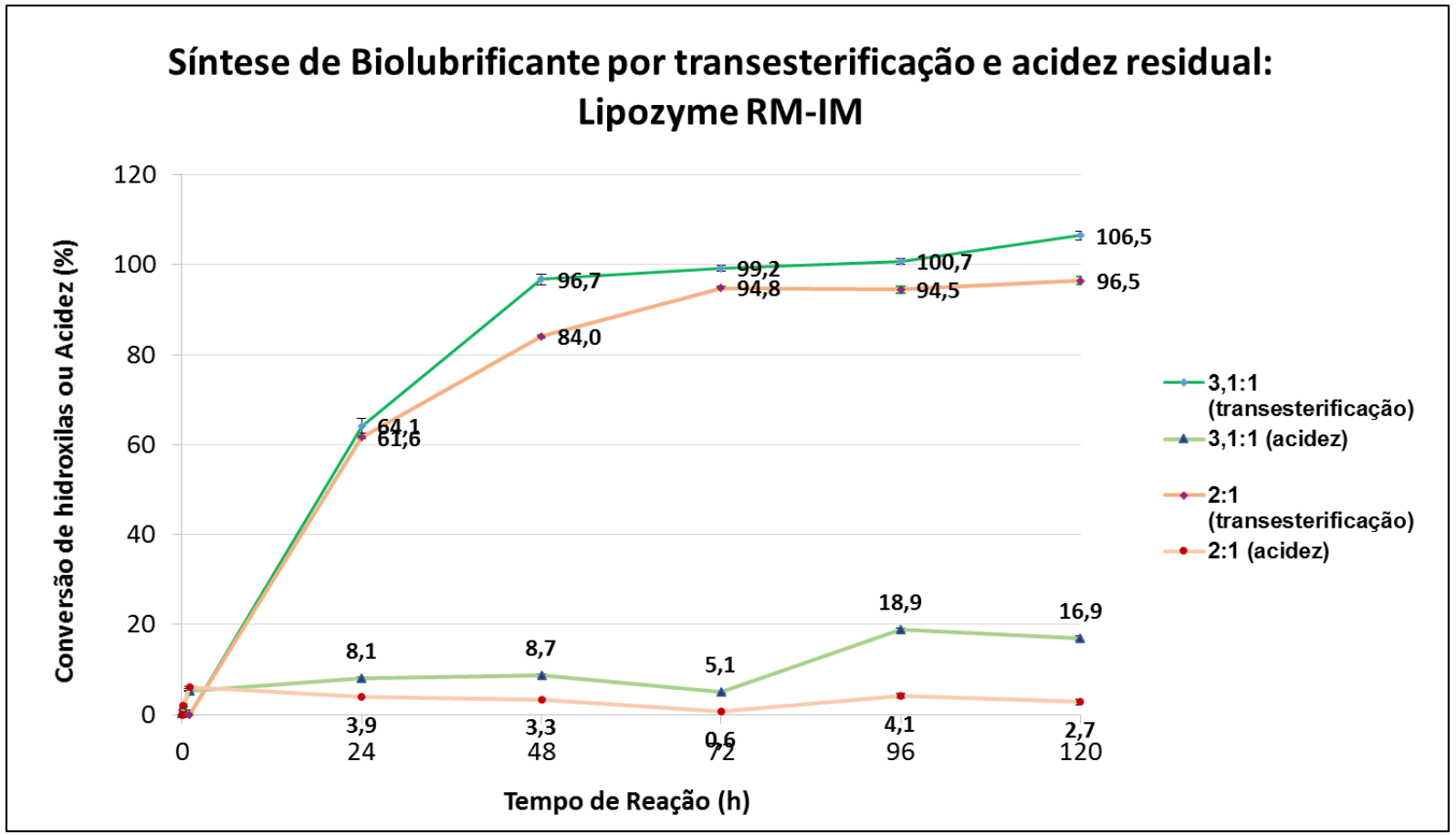


Figura 33: Cinética da síntese de biolubrificante catalisada pela lipase comercial Lipozyme RM-IM a partir de biodiesel de soja e NPG, em razão estequiométrica (2:1) ou com excesso de biodiesel (3,1:1), correlacionando o percentual de conversão de hidroxilas e o teor de acidez nas duas proporções de substrato avaliadas. . As reações foram conduzidas por 120 h em batelada simples a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m) e 20% de PES (m/m).

Os resultados obtidos nesse trabalho mostram que o PES de *R. miehei* obtido por FES em torta de babaçu é um biocatalisador promissor para ser utilizado em reações de transesterificação. Isso, somado a outras características do PES e do processo, evidenciam-no como como uma alternativa mais barata, contribuindo para solucionar o dilema do alto custo da síntese enzimática. Dentre os motivos estratégicos para a redução de custos estão o meio de cultivo do fungo, que consiste em um coproduto industrial, o fato de a produção de lubrificantes acabar por dispensar a necessidade de purificação da enzima para sua aplicação, já que não se trata de produção farmacêutica ou alimentar.

Os dados desse trabalho somam-se aos encontrados na literatura para reações conduzidas em reatores. Aguieiras aplicou o sólido fermentado de *R.miehei* em torta de babaçu para produção de biodiesel a partir de ácidos graxos livre e metanol ou etanol (AGUIEIRAS et al., 2017), alcançando conversões entre 67% e 74% após 6 horas de reação. Recentemente, a esterificação entre ácido oleico e etanol foi obtida utilizando-se torta de algodão fermentada com *R. miehei*, alcançando 80% de conversão em 4 horas de reação (AGUIEIRAS et al., 2019).

O sólido fermentado de *A. niger* obtido após FES de uma mistura de tortas de ervilha, algodão e algaroba chegou a 208 U/g de atividade hidrolítica após otimização da mistura de substratos da fermentação (MANDARI; NEMA; DEVARAI, 2020). O uso de PES oriundo do cultivo de *R. microsporus* em bagaço de cana em reações de transesterificação entre óleo de milho e etanol atingiu 70% de conversão após 96 h de reação com batelada alimentada de etanol a cada 24 horas (ZAGO et al., 2014).

5.5. CARACTERIZAÇÃO DO PRODUTO

5.5.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização por RMN dos produtos obtidos por transesterificação enzimática foi feita após 72 horas de reação, quando atingiram a conversão máxima observada. Após passagem por rotaevaporador, para remoção de água e metanol, permitiu obter-se a composição química dos biolubrificantes e informações importantes quanto ao processo sintético (Figuras 34 e 35). Os resultados indicam o total consumo do NPG em ambas as circunstâncias reacionais, indicando que a conversão na condição de razão estequiométrica não atingiu 100% não pela presença de moléculas do poliálcool não reagidas, mas pela não conversão da sua segunda hidroxila. Em ambas as condições, observa-se a presença de ácidos graxos livres, presumido

produto de hidrólise enzimática do biodiesel, e também biodiesel não reagido. A presença de mais ácidos graxos livres no produto obtido na condição de excesso de biodiesel corrobora qualitativamente os dados de acidez superiores observados anteriormente por titulometria. A ausência de metanol em ambas, produzido durante a reação, pode ser explicada pelo uso da técnica de rotaevaporação antes da caracterização das amostras. Contudo, por se tratarem de reações que ocorrem em reatores abertos, é possível que parte do metanol se perca por evaporação ainda na bancada. Esta perda por evaporação e pode favorecer o equilíbrio reacional no sentido da síntese. Posteriormente, a evaporação foi avaliada por RMN sem rotaevaporação prévia, e os resultados estão discutidos no item 5.7.

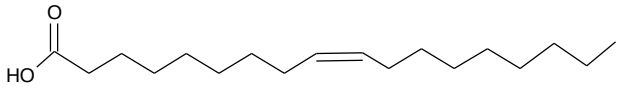
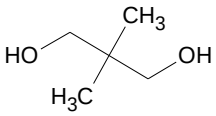
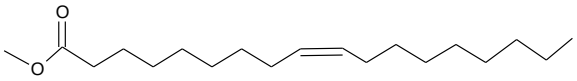
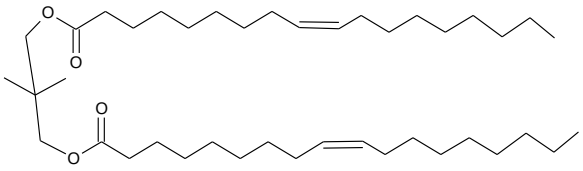
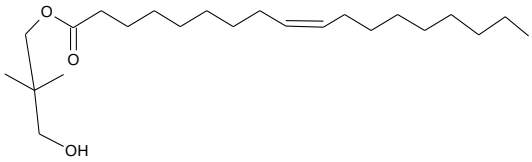
COMPOSTO	% MOLAR	% MASSA
 ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	3,9	2,2
 NEOPENTILGLICOL	0,0	0,0
METANOL	0,0	0,0
 ÉSTERES METÍLICOS	21,5	12,6
 DINEOPENTIL ÉSTERES	59,5	74,2
 MONONEOPENTIL ÉSTERES	15,2	11,0

Figura 34: Caracterização por RMN do produto obtido após 72h de reação a 45 °C com razão molar estequiométrica (2:1 – BDS:NPG) e 2,5% de água (m/m). Os compostos denominados ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÉSTERES METÍLICOS, DINEOPENTIL ÉSTERES E MONONEOPENTIL ÉSTERES estão representados com cadeias carbônicas derivadas de ácido oleico (18:1) e servem de exemplo para todos os componentes derivados deste e dos outros ácidos graxos que constituem o óleo de soja e seus derivados.

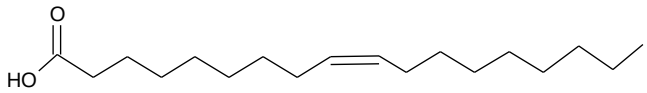
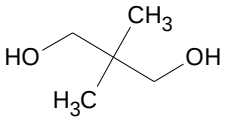
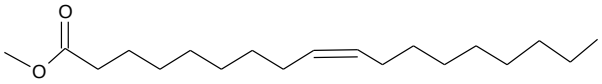
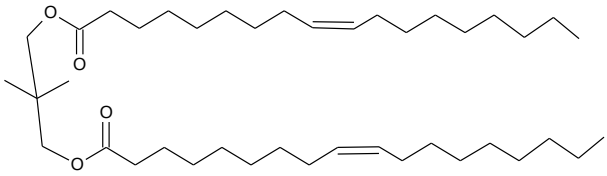
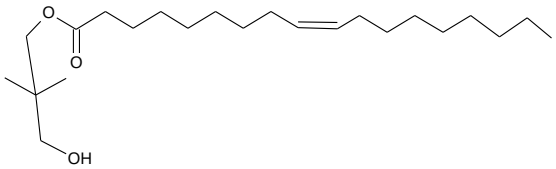
COMPOSTO	% MOLAR	% MASSA
 ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	23,5	15,7
 NEOPENTILGLICOL	0,0	0,0
METANOL	0,0	0,0
 ÉSTERES METÍLICOS	36,1	25,3
 DINEOPENTIL ÉSTERES	37,8	56,6
 MONONEOPENTIL ÉSTERES	2,6	2,3

Figura 35: Caracterização por RMN do produto obtido após 72 horas de reação a 45 °C com razão molar 3,1:1 (BDS:NPG) e 2,5% de água (m/m). Os compostos denominados ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÉSTERES METÍLICOS, DINEOPENTIL ÉSTERES E MONONEOPENTIL ÉSTERES estão representados com cadeias carbônicas derivadas de ácido oleico (18:1) e servem de exemplo para todos os componentes derivados deste e dos outros ácidos graxos que constituem o óleo de soja e seus derivados.

5.5.2. Físico-química

A caracterização das propriedades físico-químicas primeiramente avaliada tão logo concluídos os ensaios de estudo dos parâmetros de síntese por DCCR, quando condições as condições de maior rendimento foram identificadas. Nessa etapa, o produto com 85,5% de conversão após 48 horas de síntese teve suas características físico-químicas avaliadas e estão exibidas na Tabela 9.

Os poliol ésteres são desejáveis no desenvolvimento de óleos para engrenagens automotivas e aeronáuticas, por apresentarem boa estabilidade oxidativa e VI, e boa fluidez em temperaturas mais baixas, tornando-os capazes de operar em uma faixa maior de temperaturas do que os óleos convencionais (MOBARAK et al., 2014). A formulação de óleos automotivos depende do tipo de ciclo termodinâmico e do tipo de construção utilizados no motor. Óleos sintéticos automotivos costumam ser formulados com quantidades que variam de 15% a 60% de poliol ésteres, podendo chegar a 90% (NAGENDRAMMA, 2011), recebendo ainda polialfaolefinas, modificadores de fricção, aditivos detergentes e de outra natureza (RUDNICK, 2013).

Em 2004, 53% dos lubrificantes no mundo eram consumidos pela indústria automotiva, e 32% eram lubrificantes industriais (MANG; DRESEL, 2007).

Tabela 9: Caracterização físico-química do biolubrificante obtido a partir da reação entre biodiesel de soja e neopentilglicol por 48 horas, com 85,5% de hidroxilas convertidas.

Ensaio	**Resultados**
Karl Fischer (ppm)	884,4
Viscosidade a 40°C (mm²/s)	15,41
Viscosidade a 100°C (mm²/s)	4,295
Índice de Viscosidade (IV)	206
Bomba rotatória (min)	30
Fluidez (°C)	-6
IAT potenciométrico (mg KOH/g KOH)	19,8

Tabela 10: Caracterização físico-química do biodiesel de soja utilizado como matéria-prima para a obtenção do biolubrificante.

Biodiesel de Soja	
Ensaio	**Resultados**
Karl Fischer (ppm)	250
Viscosidade a 40°C (mm²/s)	4,234
Viscosidade a 100°C (mm²/s)	1,690
Índice de Viscosidade (IV)	238
Bomba rotatória (min)	21
Fluidez (°C)	0
IAT potenciométrico (mg **KOH/g KOH)**	0,535

Em relação à matéria prima, o biolubrificante apresentou estabilidade oxidativa 42% maior do que a do biodiesel (Tabelas 9 e 10 – de 21 para 30 minutos) e ponto de fluidez 600% menor (Tabelas 9 e 10 – de 0 °C para -6 °C). O índice de viscosidade (IV) manteve-se acima de 200, chegando a 206. O IV é um dos índices mais importantes nas propriedades do lubrificante. Ele indica a variabilidade do fluido com o aumento de temperatura (DA SILVA et al., 2015) e é calculado com base na viscosidade a 40 °C e na viscosidade a 100 °C. Quanto maior é o IV, menor será a diminuição da viscosidade com as mudanças de temperatura. Índices de viscosidade acima de 200 são desejáveis. Os poliol ésteres são conhecidos por seus bons índices de viscosidade, apesar de serem encontrados IV entre 46 e 229 (BASF, 2019; Croda Lubricants, 2020; Zschimmer & Schwarz, 2020). Os ésteres de NPG podem apresentar IV que variam de 145 a 207, sendo os produzidos a partir de ácido oleico os com maiores índices (HO; MCAULEY; PEPPLEY, 2019; RUDNICK, 2013). A alto teor de ácido oleico da matéria-prima (ver Tabela 1) pode ter influenciado positivamente o índice 206 obtido (Tabela 8). Óleos minerais possuem IV variando de 28 a 100 (MANG; DRESEL, 2007), o que pode ser contornado com misturas ou uso de aditivos para a formulação final. IV em torno de 200 reduzem drasticamente a necessidade de aditivos, tornando o poliol éster um bom candidato à óleo base.

Os poliol ésteres costumam apresentar maior viscosidade tanto a 40 °C quanto a 100 °C, podendo esta última ser de 5 e 30 vezes maior do que a de um monoéster, tal qual o biodiesel

(BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2013a). Em relação ao biodiesel, o lubrificante apresentou aumento de 2,5 vezes na viscosidade a 100 ºC e 3,6 vezes a 40 ºC.

Como esperado, o IAT do biodiesel foi extremamente baixo, por se tratar de um produto final acabado. O IAT do biolubrificante, contudo, apresentou-se elevado, em consonância com a presença de ácidos graxos identificada anteriormente por cromatografia gasosa. Esses ácidos graxos podem ser removidos por técnica de destilação molecular, o que pode melhorar a estabilidade térmica e a formação de depósitos pelo biolubrificante (LANSDOWN; LEE, 2010).

5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE REUTILIZAÇÃO DO PES

5.6.1 Reutilização do PES em batelada simples ou em batelada alimentada

A reutilização do biocatalisador constitui um item primordial para a viabilidade econômica de um bioprocesso. As enzimas são parte importante do custo de um processo enzimático (CASTILHO; MEDRONHO; ALVES, 2000; GOG et al., 2012) Neste trabalho, o potencial de reúso do PES foi estudado de dois modos: por lavagem com solvente após cada batelada ou por remoção do produto após decantação da enzima, seguida por adição de novos substratos em massa equivalente.

No presente estudo, a lavagem com etanol ou com hexano produziu perdas semelhantes de atividade, presumida pela queda progressiva do percentual de conversão ao longo dos quatro reúsos utilizados (Fig. 36). No primeiro reúso, a lavagem do PES resultou em queda de até 22% na conversão das matérias-primas, apresentando, a partir do terceiro reúso, uma produção muito baixa, que se manteve no quarto reúso.

Já a enzima comercial RM-IM lavada com hexano também apresentou perda, representada na redução progressiva da porcentagem de conversão das hidroxilas. Após a primeira lavagem, a enzima comercial apresentou perda semelhante à observada para o PES, continuando a perder atividade ao longo das reações, mas de forma bem menos acentuada , de forma que, após o quarto reúso, as reações conduzidas com o PES atingiram cerca de 20% de conversão de hidroxilas, enquanto as reações com o catalisador comercial atingiram 40%.

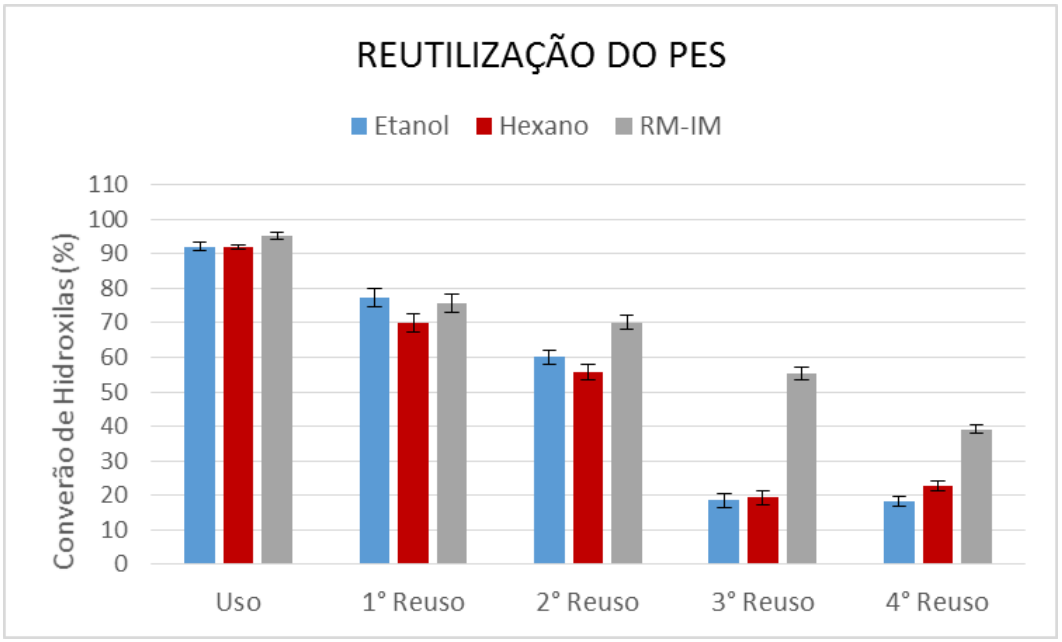


Figura 36: Reutilização da enzima em ciclos de 48 horas de reação seguidos por lavagem com solvente. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Em azul, o PES lavado com etanol; em vermelho, o PES lavado com hexano. A enzima RM-IM (em cinza) foi lavada com hexano.

Diante dos resultados de reutilização com lavagem do PES, a reutilização sem a lavagem foi examinada. Se bem-sucedida, a ausência da etapa de lavagem traria vantagens como a redução do tempo de produção pela remoção de uma das etapas do processo e também a eliminação da utilização de mais insumos na cadeia produtiva. Para tal, após 72 horas de reação, a agitação foi interrompida para permitir a decantação do PES, ilustrado na Figura 19 da Seção 4.10. Em seguida, o sobrenadante foi removido e pesado. A massa removida foi utilizada para o cálculo da reposição de matéria-prima em cada reator, e após a adição, retomou-se a agitação e reiniciou-se a reação por 72 horas. Os resultados obtidos de conversão de hidroxilas foram obtidos com o sobrenadante de cada um dos 5 ciclos, e os resultados podem ser visto na Figura 37.

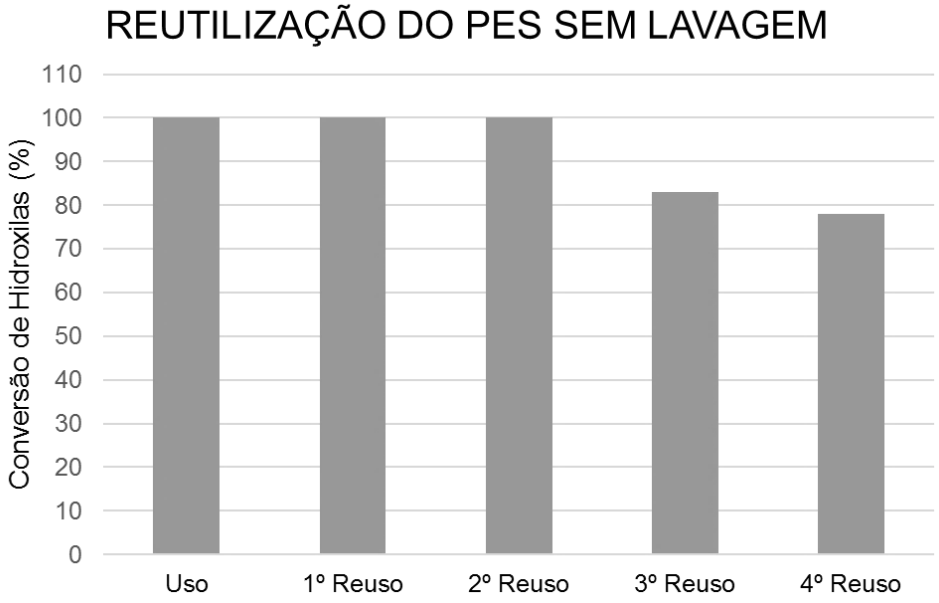


Figura 37: Reutilização do PES em ciclos de 72 horas de reação e sem lavagem. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Ao final das reações, o meio reacional era removido após a decantação do PES e novos substratos eram adicionados, seguindo a razão molar inicial (3,1:1 de biodiesel de soja e NPG) em massa equivalente à retirada de produto.

A reutilização do PES apresenta melhores resultados quando o processo é conduzido em batelada alimentada do que em batelada simples, quando o PES é lavado com solventes para a retirada do meio reacional. A partir do 1° reúso, parte do meio reacional do ciclo anterior, que envolvia a enzima decantada, acaba contabilizado para o percentual de conversão, já que a cada ciclo a massa removida era de cerca de 60% da massa total inicial. Contudo, a ausência de lavagem retornou 100% de conversão em até o 2° reúso, indicando que eliminação da etapa de lavagem teve sim efeito positivo sobre a eficiência do biocatalisador.

Os resultados indicaram que o biocatalisador pode ser reutilizado sem perda significativa de atividade por mais ciclos quando a etapa de lavagem é eliminada. Sem a lavagem, o PES mantém-se envolvido por parte do produto e pelos ácidos graxos remanescentes.

Aguieiras e colaboradores (2014) demonstraram que o PES de *R. miehei* cultivado em torta de babaçu mantém alta sua atividade de esterificação para produção de biodiesel mesmo após 10 lavagens, apresentando uma redução total de apenas 15% dos valores iniciais de conversão. O mesmo estudo avaliou a atividade hidrolítica do PES após a 10ª lavagem e o mesmo apresentava 94,5% da sua atividade inicial. Estes resultados demonstraram que o PES apresenta robustez e estabilidade, revelando também sua capacidade como suporte estrutural para a adsorção da enzima. Contudo, no caso da transesterificação, os resultados do presente

estudo demonstraram que o PES não foi capaz de manter boa conversão após utilizações sucessivas quando submetido a lavagens.

A literatura reporta grande dinamismo no que tange à estabilidade das lipases recuperadas em reações de esterificação e transesterificação, demonstrando que a forma de recuperação mais adequada não depende apenas da natureza da enzima, mas também dos substratos e do sistema reacional empregado. A literatura aponta a lavagem de lipases após reações de esterificação e transesterificação como uma maneira não só de recuperar a enzima, mas de propiciar uma melhora na reutilização em decorrência da melhor difusão dos substratos por meio da remoção da camada de substratos/produtos não polares envolvendo a enzima (CANET et al., 2016; COSTA RODRIGUES et al., 2009; SHIMADA et al., 2002; SUN et al., 2012). Costa Rodrigues e demais pesquisadores (2009) encontraram que a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus*, a Lipozyme TL-IM, apresentava perda de atividade após sucessivos ciclos de reações de transesterificação entre óleo de soja e etanol e conseguiram reduzir a perda de atividade para apenas 20% após sete reúsos utilizando lavagem enzimática com hexano. A lavagem com etanol, água ou propanol não foi efetiva. Sun e colaboradores (2012), no entanto, observaram um fenômeno inverso: a atividade sintética da mesma lipase comercial de *T. lanuginosus*, durante seu reúso em reações de transesterificação entre óleo de coco e óleo fúsel, foi mantida quando esta foi recuperada por lavagem com etanol ou água. Contudo, quando submetida à lavagem com hexano, a atividade decaia progressivamente de modo similar ao da enzima sem lavagem.

Apesar da ausência de lavagem para recuperação enzimática apresentar a possibilidade de promover a inibição da enzima pelo substrato, a literatura recente aponta que a presença de ácidos graxos pode aumentar a atividade de transesterificação enzimática em estudos conduzidos com lipase recombinante de recombinante de *Rhizopus oryzae* (CANET et al., 2016). Assim, no caso da transesterificação, é possível que a ausência de lavagem interfira positivamente na atividade do PES pela não remoção dos ácidos graxos associados ao mesmo. Além dos ácidos graxos, ésteres podem ter efeito positivo na atividade sintética de lipases. WATANABE et al. (2005) observaram que o tratamento prévio da lipase de *Candida antarctica* com oleato de metila ou óleo de soja promoveu melhora nas taxas de metanólise do óleo de soja. No presente trabalho, os resultados indicaram que o biocatalisador pode ser reutilizado com reduzida perda de atividade por mais ciclos quando a etapa de lavagem com etanol ou hexano é eliminada. Sem a lavagem, o PES mantém-se envolvido pelos ésteres dos substratos e produtos e também pelos ácidos graxos remanescentes; apesar de não ser possível inferir qual

das substâncias teria maior relevância neste efeito, isto parece favorável no sistema reacional aqui proposto.

A desativação de lipases decorrente da sua instabilidade na presença de álcoois de cadeia curta está amplamente discutida na literatura (CHEN; WU, 2003; NELSON; FOGLIA; MARMER, 1996; NOUREDDINI; GAO; PHILKANA, 2005; SHIMADA et al., 2002; TALUKDER et al., 2009). No presente trabalho, a formação de metanol poderia contribuir para a inativação observada. Contudo, a não detecção de metanol nos ensaios de RMN indica que este deve ter sido eliminado por evaporação, tendo em vista que as reações são conduzidas em reatores abertos. Isso, somado à redução da inativação observada nas reações sem lavagem do PES demonstram que o metanol não parece relevante para explicar a inativação das enzimas nesta síntese.

5.6.2. Estabilidade do biocatalisador: estudo da dessorção enzimática após lavagem com solvente

Devido à perda progressiva de conversão na reutilização do PES foi aventada a hipótese de que os substratos ou mesmos os produtos da reação de transesterificação pudessem provocar a dessorção das lipases, o que seria responsável pela perda de atividade observada. Por isso, foram conduzidos ensaios de zimografia e SDS-PAGE para investigar a perda de atividade hidrolítica e de esterificação após 3 reutilizações sucessivas. Para tal, após as reações e a lavagem com hexano, parte do PES foi submetida a extração aquosa de proteínas, como descrito no item 4.3, e os extratos foram submetidos aos experimentos de SDS-PAGE e Zimografia, conforme descritos no item 4.4. Na Figura 38, observa-se que as bandas que indicam atividade reacional, destacadas pelos retângulos alaranjados, aparecem intensas nos géis de hidrólise e de esterificação tanto no PES sem uso, aplicado como controle positivo, quanto nos PES lavados uma, duas ou três vezes.

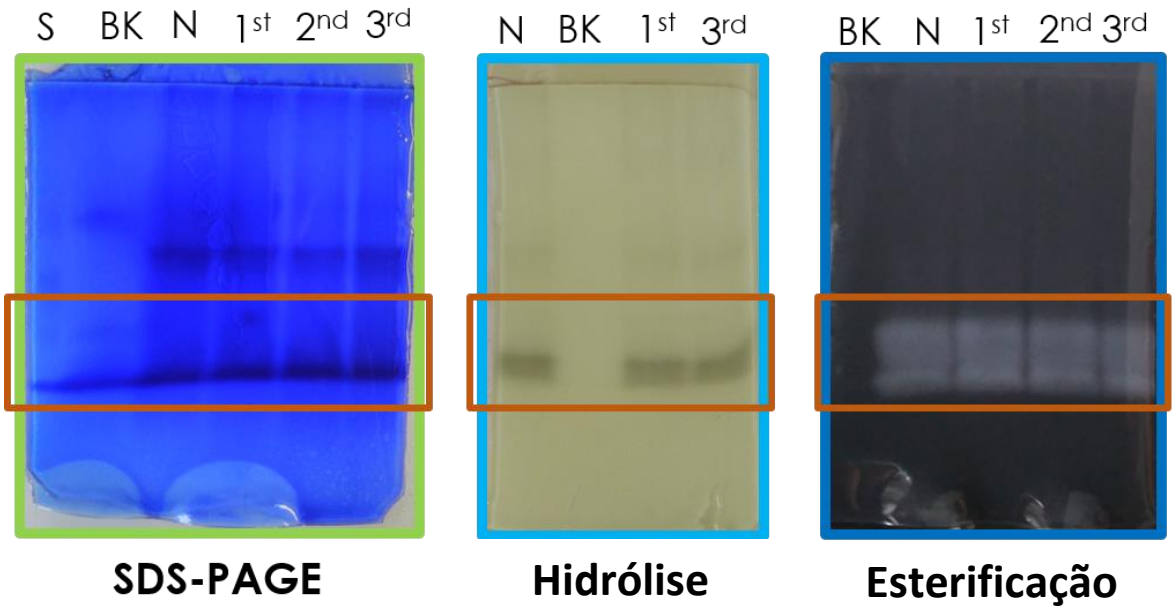


Figura 38: SDS-PAGE e Zimografia para atividade do PES e proteínas totais após ciclos sucessivos de reações e lavagens com hexano. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Em seguida, o meio reacional era lavado com hexano para recuperação do PES, e este era seco em dessecador por 24 h. Em seguida, o estrato enzimático líquido deste PES foi submetido à SDS-PAGE ou Zimograma, em meio reacional aquoso contendo α-naftil-acetato (para hidrólise) ou meio reacional não-aquoso contendo biodiesel de soja e NPG (razão molar de 3,75:1). S: marcador de massa molecular; BK: torta de babaçu (controle negativo); N: PES novo; 1st: PES reagido e lavado uma vez; 2nd: PES reagido e lavado duas vezes; 3rd: PES reagido e lavado três vezes. Ambas as atividades hidrolítica e de esterificação foram mantidas qualitativamente similares até a terceira lavagem.

Estes ensaios de SDS-PAGE e zimografia dos PES após as sucessivas reações e lavagens mostraram, de modo qualitativo, que a atividade se manteve semelhante até a terceira lavagem, permitindo concluir-se que as enzimas estão fortemente aderidas ao PES, e quantidade de enzimas lixiviadas para o meio reacional , após sucessivos ciclos reacionais de lavagens, deve provavelmente ser insuficiente para afetar a atividade enzimática presente no PES. Estes resultados são concordantes com a literatura (AGUIEIRAS et al., 2014) e reforçam que o cultivo do fungo na torta de babaçu resulta não só em um biocatalisador bem-sucedido na síntese proposta, mas em um preparado enzimático seguro e estável do ponto de vista da regularidade na carga enzimática. A redução de atividade, quando comparada com outras sínteses, pode ser fruto de fenômenos inerentes ao poliálcool ou ao poliol éster.

5.7. OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO: REMOÇÃO DE ACIDEZ, APROVEITAMENTO DA MATÉRIA-PRIMA E REUTILIZAÇÃO DO CATALISADOR ATRAVÉS DA APLICAÇÃO DE CONDIÇÕES DE BATELADA ALIMENTADA

Os resultados deste trabalho chegaram a um produto com alto percentual de conversão, com boas propriedades físico-químicas, produzido por catálise enzimática utilizando um biocatalisador obtido a partir de cultivo em coprodutos agroindustriais. Contudo, alguns aspectos chamavam a atenção como desafios que tornariam a síntese ainda mais promissora: a necessidade de obter produtos reacionais com acidez reduzida. Este aspecto, além de reduzir a necessidade de etapa destilação molecular, aumentaria a quantidade de produto formado, uma vez que estes ácidos graxos poderiam ser esterificados às hidroxilas do NPG. A redução da proporção de biodiesel presente no produto final, juntamente com a redução da acidez, também significaria uma maior produtividade e ainda um melhor aproveitamento da matéria-prima. Por isso, buscando melhorar estes dois parâmetros, foi avaliada a realização do processo por batelada alimentada. Para tal, procedeu-se a reação com razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG) e 2,5% de água por 72 horas; após este período, calculou-se, a partir do resultado de conversão e de acidez, o número de mols de biodiesel restantes no reator (desconsiderando se foram hidrolisados ou não). Então, adicionou-se a massa de NPG necessária para atingir agora a proporção estequiométrica, de modo a converter o excedente inicial de biodiesel. A reação seguiu por mais 72 horas, totalizando 144 horas de reação. Uma segunda possibilidade para o processo de batelada alimentada seria a adição de etanol, em substituição ao NPG, um álcool que pode ser obtido de forma renovável e que possui menor potencial poluente do que o metanol (HILL, 2000). A adição de etanol foi pensada como alternativa visando principalmente a remoção da acidez, uma vez que as reações de esterificação são mais rápidas (AMINI et al., 2017; CANET et al., 2016; FERNANDES et al., 2007; LINKO et al., 1995) e tornariam o produto um "blend" de ésteres metílicos e etílicos e poliol ésteres, com baixa acidez. Conforme ilustrado na Figura 39, a adição de etanol resultou na redução de acidez após 24 horas desta adição. Contudo, a acidez voltou a aumentar nas horas subsequentes, demonstrando a reversibilidade da esterificação dos ácidos graxos de soja, provenientes do biodiesel, com o etanol. Já a adição de NPG, demonstrada na Figura 40, resultou na redução progressiva e irreversível da acidez, indicando que a esterificação destes com o NPG gera ésteres mais estáveis e resistentes à hidrólise pela própria enzima de *R. miehei*, tal qual já havia sido indicado pelas cinéticas de 120 horas discutidas na seção 5.4 (Figuras 32 e 33). O teor de ésteres metílicos, antes e após a adição de NPG também foi investigado. A adição do poliálcool

resultou no consumo de biodiesel, como visto na Figura 41. O teor de acidez, mostrado na Figura 39, reduziu para menos de 4%, e o teor de biodiesel remanescente caiu para 1,25% (Fig. 40). Estes resultados mostram que a condução do processo de síntese no modo de batelada alimentada foi capaz de induzir o consumo de ácidos graxos do meio reacional e de parte do biodiesel excedente na reação.

O metanol é o álcool mais utilizado em esterificações, devido ao seu baixo custo e sua alta reatividade (RODRIGUES et al., 2008), contudo, este álcool apresenta baixa toxicidade ao meio ambiente e à saúde humana. A possibilidade de utilizar o etanol, além de reduzir problemas relacionados aos cuidados inerentes ao uso de metanol, possibilita a integração da esterificação com processos de produção de bioetanol por fermentação (ADACHI et al., 2013; REMONATTO et al., 2016), tornando possível, no futuro, avaliar a viabilidade da realização destas diferentes reações em plantas de produção integradas.

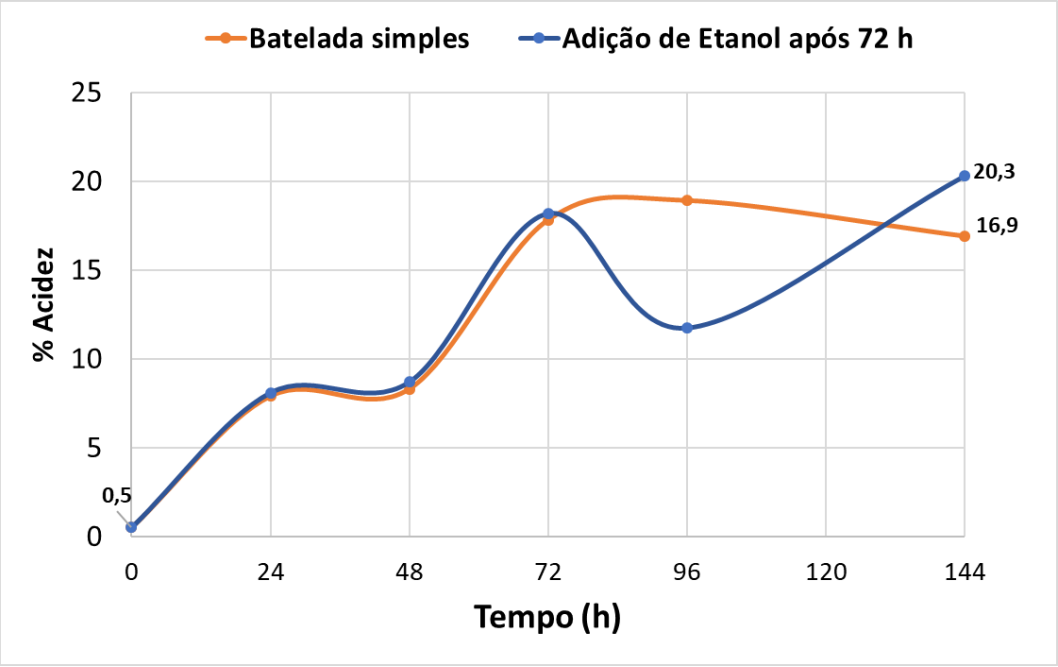


Figura 39: Teor de acidez do meio reacional em reações conduzidas em batelada simples ou alimentada com etanol. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Após 72 horas de reação houve adição de etanol, e a reação foi mantida até completar 144 horas. A curva em azul mostra o teor de acidez da reação onde foi adicionado o etanol em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica.

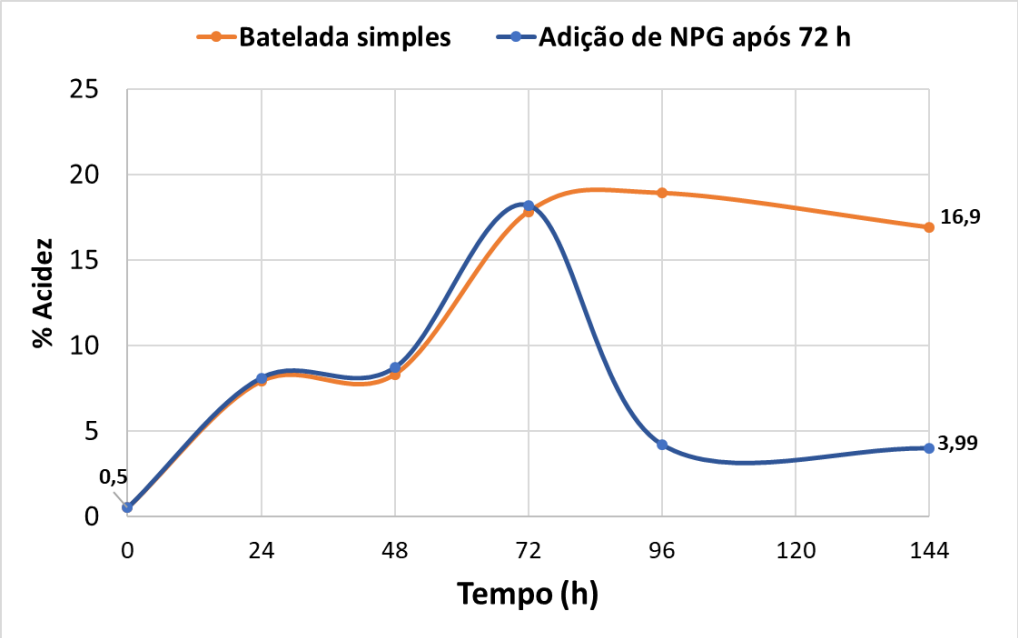


Figura 40: Teor de acidez do meio reacional em reações conduzidas em batelada simples ou alimentada com NPG. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Após 72 horas de reação houve adição de etanol, e a reação foi mantida até completar 144 horas. A curva em azul mostra o teor de acidez da reação onde foi adicionado o etanol em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica.

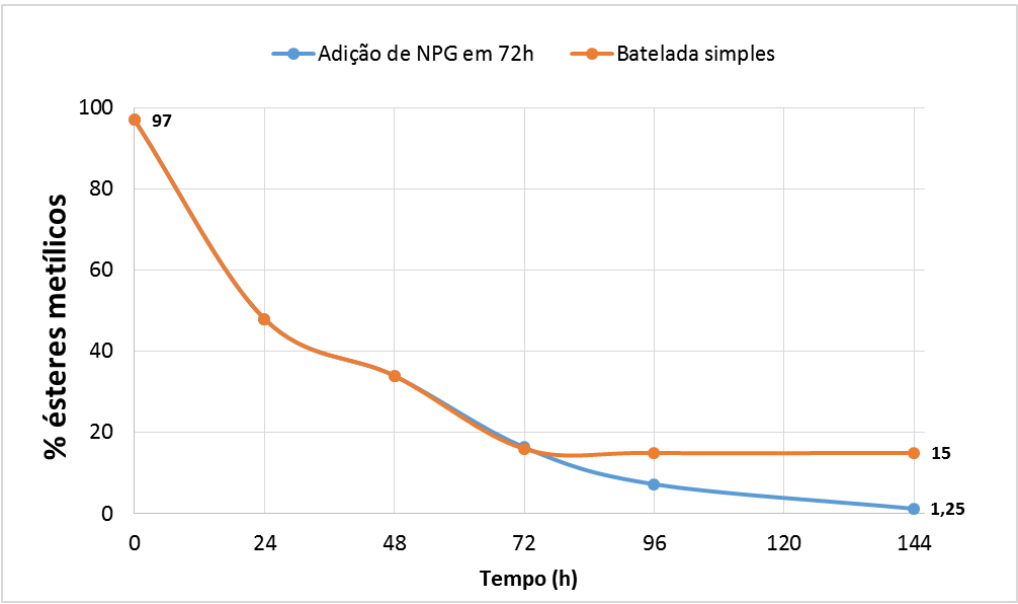


Figura 41: Teor de ésteres metílicos do biodiesel de soja em reações conduzidas em batelada simples ou alimentada com NPG. As reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG). Após 72 horas de reação houve adição de etanol, e a reação foi mantida até completar 144 horas. A curva em azul mostra o teor de acidez da reação onde foi adicionado o etanol em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica. A curva em azul mostra o teor de ésteres metílicos da reação onde foi adicionado NPG em 72 horas para atingir a razão molar estequiométrica.

Para a proposta de um sistema de batelada alimentada, foi estudada a reutilização do PES ao longo de 5 ciclos de 144 horas. Após cada ciclo, a agitação foi interrompida, o meio reacional sobrenadante foi removido e foram adicionados substratos em massa correspondente à removida, novamente com razão molar inicial de 3,1:1. Os resultados de conversão de hidroxilas destes ensaios de reúso estão dispostos na Figura 42, em gráfico comparativo que inclui os resultados das metodologias de reúso discutidas na Seção 5.6.1. A reutilização do PES em batelada alimentada demonstrou-se altamente favorável ao longo dos 5 ciclos de 144 horas, não apresentando perda do percentual de conversão de hidroxilas. Estes resultados indicam que a batelada alimentada foi bem-sucedida na redução da acidez e no melhor aproveitamento da matéria-prima, e propiciou maior estabilidade para o biocatalisador.

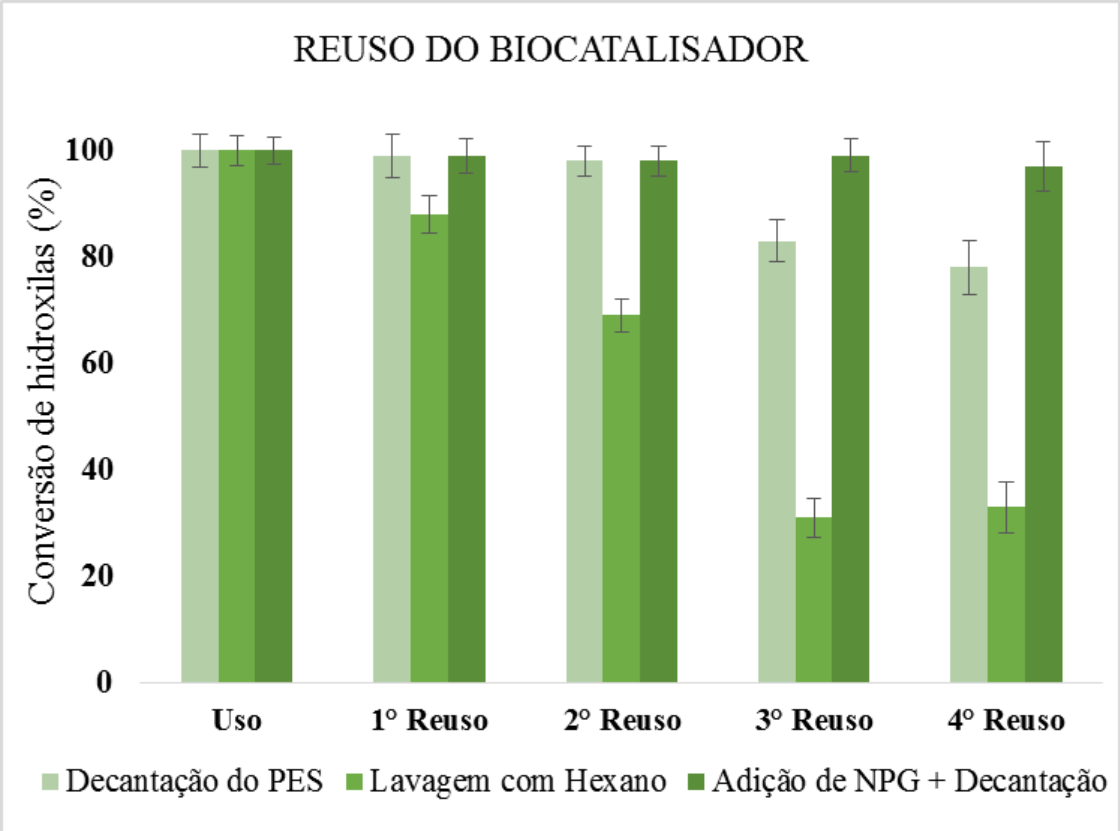


Figura 42: Reúso do biocatalisador produzido a partir da fermentação por *R. miehei* da torta de babaçu por lavagem com hexano (verde médio) ou decantação do PES (verde claro), ambos mostrados nas figuras 32 e 34, e a reutilização por decantação do PES na batelada alimentada com NPG (verde escuro). Na batelada alimentada foi adicionado NPG suficiente para atingir a razão equimolar uma vez após 72 horas de reação, e a mesma foi finalizada após 144 horas. As outras reações foram interrompidas após 72 horas, e o PES foi lavado com hexano ou decantado conforme determinado. Todas as reações foram conduzidas a 45 °C, empregando-se 2,5% de água (m/m), 20% de PES (m/m) e razão molar de 3,1:1 (BDS:NPG).

O produto desta síntese também foi caracterizado por RMN (Figura 43). Os resultados desta caracterização foram comparados com os dois resultados anteriores de RMN da Seção 5.5.1 na Tabela 11. Com esta síntese por batelada alimentada, foi possível obter o produto com menor acidez e menor teor de ésteres metílicos, e com maior percentual de dineopentilglicol ésteres, a substância lubrificante de interesse.

Para esta caracterização, o produto foi analisado sem passagem prévia por rotaevaporador, ao contrário das caracterizações anteriores, possibilitando a detecção da presença de água e metanol após a síntese. O laudo técnico indicou a não detecção de água e a presença de quantidades inferiores a 0,1% de metanol na amostra enviada. Estes resultados confirmam que o metanol e a água sofrem um processo de evaporação durante as reações como sugerido na Seção 5.5.1. Se por um lado a evaporação do metanol favorece o equilíbrio no sentido da transesterificação e evita a inibição enzimática, por outro ela gera poluição ambiental, insegurança no ambiente de trabalho e perda de um insumo versátil e que pode ser reaproveitado. Por isso, sugere-se, para futuros trabalhos, que o sistema de síntese seja pensado de forma a captar o metanol que evapora do sistema, estudando-se a possibilidade de serem aplicadas bombas de vácuo ou reatores fechados e canalizados.

Tabela 11: Comparação entre as composições obtidas por RMN apresentadas nas Figuras 34, 35 e 43, em síntese por batelada simples e por batelada alimentada com NPG.

	Batelada alimentada		**Batelada simples**		**Razão molar de 2:1**	
Molécula	**% molar**	**% massa**	**% molar**	**% massa**	**% molar**	**% massa**
Ácidos graxos livres	12,8	6,9	23,5%	15,7%	3,9%	2,2%
Neopentilglicol	0	0	0	0	0	0
Metanol	0	0	0	0	0	0
Ésteres metílicos	7,2	4,2	36,1%	25,3%	21,5%	12,6%
Dineopentilglicol ésteres	65,1	78,4	37,8%	56,6%	59,5%	74,2%
Mononeopentil ésteres	15	10,5	2,6	2,3	15,2%	11,0%

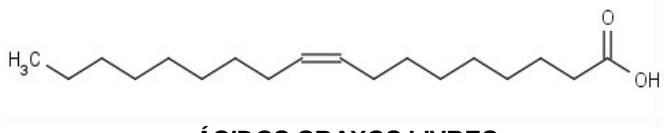
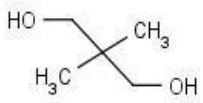
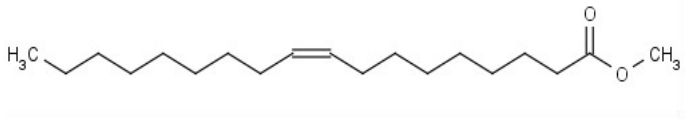
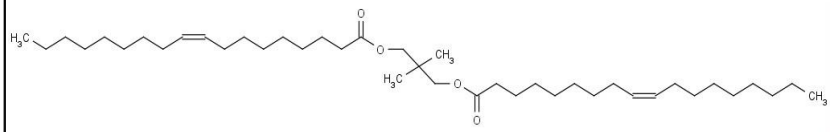
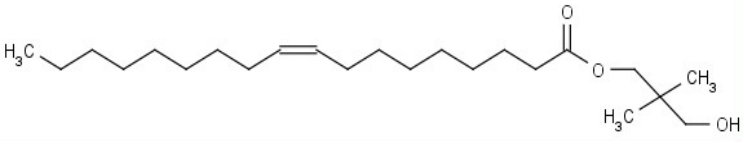
COMPOSTO	% MOLAR	% PESO
 ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	12,8	6,9
 NEOPENTILGLICOL	0,0	0,0
METANOL	0,0	0,0
 ÉSTERES METÍLICOS	7,2	4,2
 DINEOPENTIL ÉSTERES (PRODUTO DESEJADO)	65,1	78,4
 MONONEOPENTIL ÉSTERES	15,0	10,5
17-014989-77		

Figura 43: Caracterização por RMN do biolubrificante obtido a partir da transesterificação entre o biodiesel metílico de soja e o neopentilglicol (NPG), em razão molar de 3,1:1, realizada em batelada alimentada com NPG uma vez após 72 horas de reação, e finalizada após 144 horas. Uma quantidade inferior a 0,1% de metanol foi detectada pela metodologia; não foi detectada a presença de água. Os compostos denominados ÁCIDOS GRAXOS LIVRES, ÉSTERES METÍLICOS, DINEOPENTIL ÉSTERES E MONONEOPENTIL ÉSTERES estão representados com cadeias carbônicas derivadas de ácido oleico (18:1) e servem de exemplo para todos os componentes derivados deste e dos outros ácidos graxos que constituem o óleo de soja e seus derivados.

5.8. MONITORAMENTO DE REAÇÃO EM TEMPO REAL ATRAVÉS DE ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Paralelamente, investigou-se a possibilidade de acompanhamento da síntese em tempo real, usando uma sonda de infravermelho. Tanto o biodiesel de soja quanto o biolubrificante gerado são compostos de ésteres, logo, o acompanhamento da síntese de um éster a partir de outro éster é um limitador da diferenciação entre os interferogramas. Por isso, conduziu-se um ensaio de 72 horas de reação com razão molar de 3,1:1, com coletas de interferogramas a cada 3 minutos. O interferograma do meio reacional final, o biolubrificante, pode ser visto na Figura 44, juntamente com os interferogramas do meio reacional inicial e do biodiesel de soja. A captação de interferogramas do extrato aquoso do PES e a comparação entre os interferogramas obtidos antes e depois da adição de PES demonstraram que o mesmo não altera o perfil das bandas obtidas (dados não mostrados). Em todos os interferogramas, é possível identificar uma banda na faixa de 1740 cm^{-1}, que corresponde à frequência de estiramento da ligação carbono-oxigênio da carbonila dos ésteres e a banda em 1169 cm^{-1}, que é característica da ligação simples entre carbono-oxigênio, também presente nos ésteres (Fig. 44, destacados em azul) (AFIDA et al., 2015). As duas bandas em 2900 cm^{-1} são relativas às ligações C–H_2 das cadeias alquídicas, assim como as bandas entre 1461 cm^{-1} e 1463 cm^{-1} (SKOOG et al., 2014). As duas bandas de 2341 e 2361 números de onda (cm^{-1}) presentes no interferograma do biolubrificante correspondem às frequências de estiramento da molécula de CO_2 (SANTOS, 2015), e provavelmente vem da dissolução do CO_2 atmosférico no meio reacional durante o processo (Fig. 44, com destaque em amarelo). No meio reacional inicial, a presença do NPG pode ser identificada pela banda em torno de 1056 cm^{-1}, presente no meio reacional inicial, correspondente ao estiramento da ligação carbono-oxigênio de álcoois primários, e uma banda de vibração larga entre 3443 a 3450 cm^{-1}, características do modo de vibração de grupos hidroxilas (CORTEZ; MEIRA, 2008; VOLLHARDT; SCHORE, 2013). Estas mesmas bandas foram identificadas nos interferogramas obtidos a partir do NPG fundido (dados não mostrados), condizentes com o interferograma consultado na plataforma NIST (CAS: 126-30-7) (COBLENTZ SOCIETY, 1960). Como a banda de vibração larga também está presente no espectro da água (COBLENTZ SOCIETY, 1969), poderia ser investigada a possibilidade de utilizar o pico de 1056 cm^{-1} para quantificar a formação de ésteres de neopentilglicol.

Durante a síntese por esterificação, o desaparecimento da banda da carbonila funciona como um indicador qualitativo de sucesso da síntese, pois significa o consumo dos ácidos

graxos (G. KNOTHE, 2001; MONTEIRO et al., 2008). Em reações de transesterificação entre o óleo de soja e o metanol para síntese de biodiesel (MAHAMUNI; ADEWUYI, 2009), a diferenciação entre o óleo e o biodiesel pode ser feita pelas duas bandas entre 1188 cm^{-1} e 1200 cm^{-1}, decorrentes do estiramento da ligação O-CH_3 presente somente nos ésteres metílicos (DUBÉ et al., 2004); os ésteres de glicerol, por sua vez, apresentarão duas bandas de 1370 e 1400 cm^{-1} resultantes das ligações O-CH_2 (SIATIS et al., 2006). Contudo, estas últimas faixas não apresentam distinção clara entre o BDS e os ésteres de neopentilglicol, uma vez que as hidroxilas do NPG também estão ligadas a carbonos primários. Uma discreta diferença foi observada quanto à banda de 1200 cm^{-1}, que é perceptível no espectro do BDS mas discreta no do biolubrificante (Fig. 44, círculo vermelho), e pode ser relacionada à natureza metílica dos seus ésteres. Logo, apesar das limitações inerentes ao acompanhamento da transesterificação por FTIR, o uso desta banda já foi investigado para avaliação qualitativa da ocorrência ou não de síntese de ésteres de etilenoglicol pela transesterificação entre ésteres metílicos de soja, de pinhão-manso ou de óleo de cozinha usado e o diálcool etilenoglicol por catálise química (ATTIA et al., 2020), mas não há trabalhos que utilizem a técnica para aplicação no monitoramento quantitativo de transesterificações. Logo, mais estudos são necessários para avaliar a possibilidade de uso da banda em 1200 cm^{-1} para quantificação de sínteses dessa natureza.

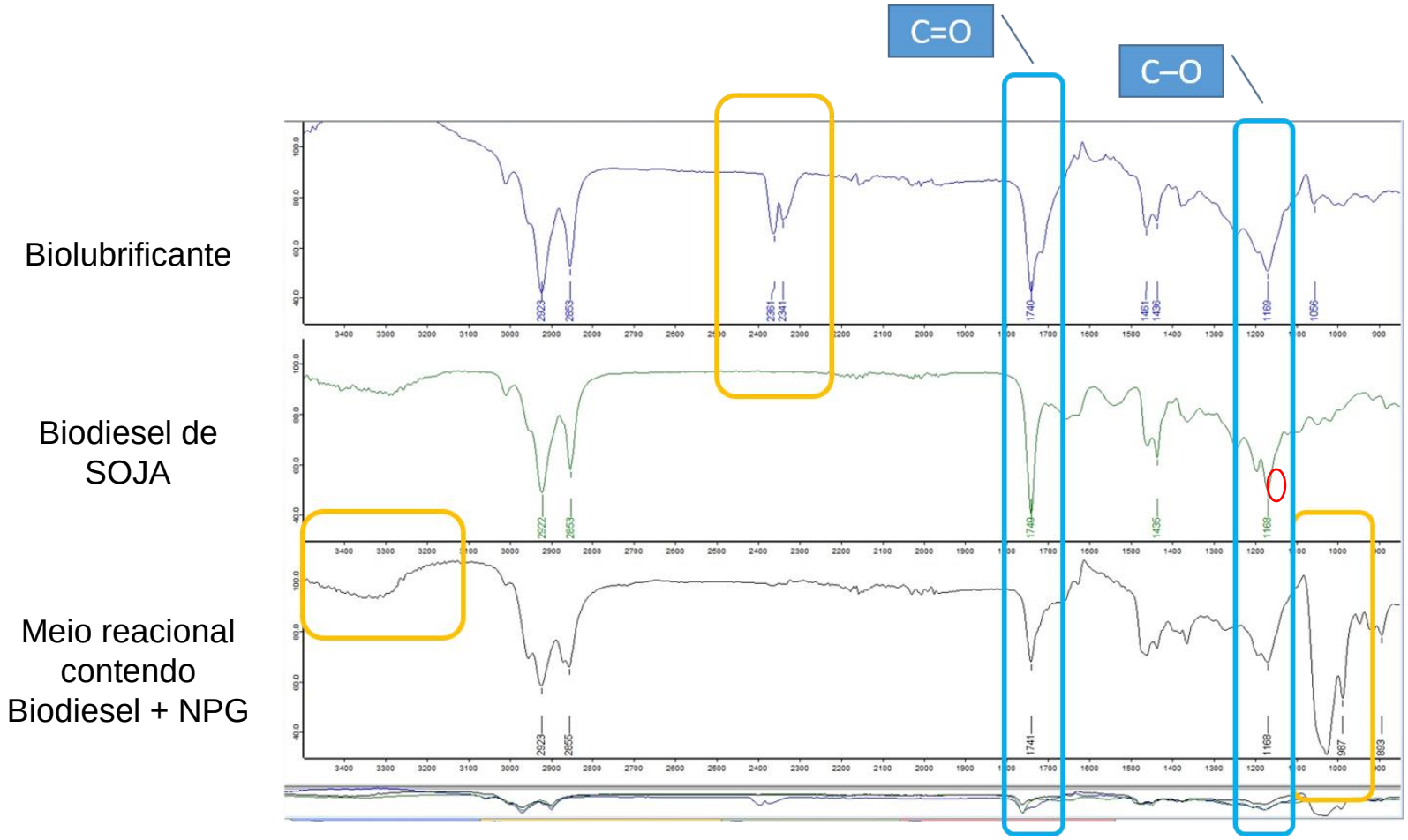


Figura 44: Espectro de infravermelho do biolubrificante obtido a partir de biodiesel de soja e NPG, em razão molar de 3,1:1 e contendo 2,5% de água (m/m), catalisado pelo PES de *R. miehei*, por 72 h a 45 °C. Também são mostrados os espectros do biodiesel de soja e do meio reacional (biodiesel de soja + NPG) antes da adição do PES.

5.9. BIODEGRADABILIDADE DO BIOLUBRIFICANTE

A biodegradabilidade trata do destino ambiental de uma substância como resultado da degradação bioquímica por microrganismos. Contudo, não existe uma definição uniforme de biodegradabilidade ou de segurança ambiental. Internacionalmente, existe uma ampla gama de definições de descritas por órgãos como o Conselho da Organização Europeia para o Desenvolvimento de Testes de Combustíveis e Lubrificantes (CEC), Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) e a Sociedade Americana de Ensaios e Materiais (ASTM). Todas tratam, em comum, a biodegradação como um processo de decomposição ou transformação de uma substância causada por organismos ou suas enzimas. O processo de biodegradação pode ser analisado em condições aeróbias e anaeróbias, em água doce ou água do mar ou no solo. Na maioria dos casos, a biodegradabilidade é avaliada medindo a biodegradabilidade aeróbica de uma substância em um meio aquoso. A biodegradabilidade de substâncias orgânicas pode ser avaliada usando uma ampla variedade de procedimentos de teste, mas os mais comumente adotados são os ensaios especificados nas Diretrizes da OCDE para o teste de produtos químicos (BERAN, 2001).

Para os ensaios químicos, a biodegradação (geralmente aeróbica) pode ser dividida em duas etapas: a primeira consiste no desaparecimento da substância original, chamada de biodegradabilidade primária, e a segunda baseia-se na degradação completa em CO_2 e H_2O (biodegradabilidade secundária ou final). A degradação primária significa alteração na estrutura química da substância com consequente perda de propriedades específicas, e pode ser obtida com testes como o CEC-L-33-A-93 (CEC, 1995). Embora a degradação primária descreva o desaparecimento do composto orgânico original, isso não indica necessariamente que a substância é completamente biodegradável (TOCCI, 2004). Além disto, este teste, muito embora tenha sido amplamente aplicado, tem sido preterido também por empregar clorofluorcarbonetos no seu processo (MÜLLER-ZERMINI, 2010). Uma comparação entre as duas metodologias pode ser vista na Figura 45.

O teste de Biodegradabilidade Imediata 301B normatizado pela OECD (OECD, 1992), é largamente utilizado para avaliação da biodegradabilidade de lubrificantes e seus componentes, destacando-se por ser adequado para materiais pouco hidrossolúveis, adsorventes e não voláteis (BERAN, 2001; CECUTTI; AGIUS, 2008).

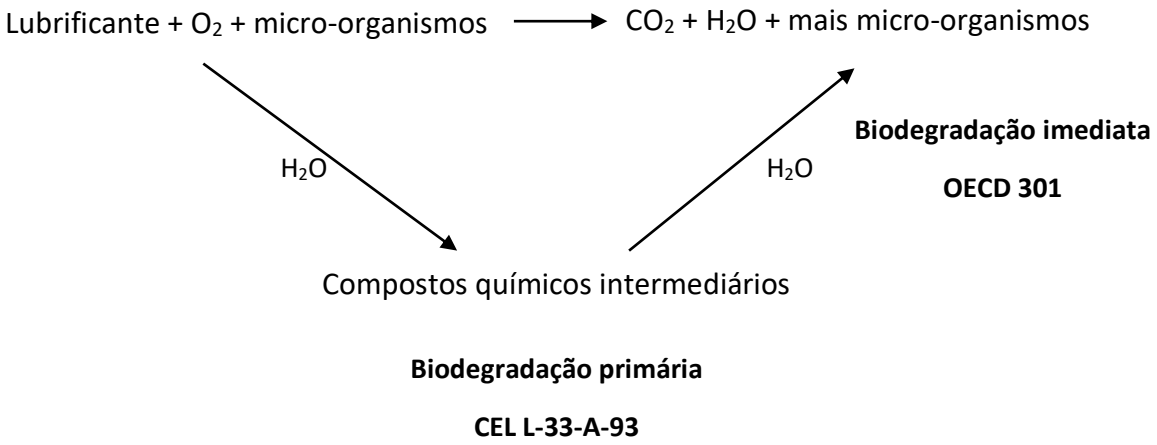


Figura 45: Comparação entre a biodegradabilidade primária e a final (ou imediata). Traduzido e adaptado de (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2012b)

O potencial biodegradável do lubrificante pode ser inferido baseado em suas características moleculares. Álcoois, ácidos, aldeídos, ésteres e amidas são grupos funcionais com efeito positivo na biodegradação (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2013b). Contudo, uma análise de biodegradabilidade é adequada para tornar mais concreto o quão biodegradável é a molécula. Isto, somado às características físico-químicas do lubrificante, tem impacto direto nas aplicações em que o mesmo será vantajoso. Por isso, uma amostra do lubrificante foi submetida a um teste de biodegradabilidade imediata, conforme a norma OECD 301B. A amostra enviada foi gerada a após a batelada alimentada.

Tabela 12: Porcentagem de CO_2 liberado na solução de benzoato de sódio, na solução da contendo o biolubrificante e na solução de inibição em função do período de incubação de dias.

Dias de incubação	Tratamentos				
	Benzoato de Sódio		BIOLUBRIFICANTE		Inibição
	CO_2 – 1	CO_2 – 2	CO_2 – 1	CO_2 – 2	CO_2 - 1
1º	8,83	8,98	0,00	0,00	6,22
3º	18,80	18,90	0,00	0,00	13,84
6º	29,03	28,48	0,00	0,00	21,99
8º	39,01	37,11	0,00	0,00	31,17
10º	50,18	47,70	3,05	1,45	41,62
13º	62,46	59,43	12,80	12,70	51,81
18º	74,69	70,66	26,55	13,95	60,96
23º	87,62	83,19	40,51	26,60	70,81
28º	99,42	95,69	62,91	44,61	80,85
Total Médio	97,55		53,76		80,85

Legenda: CO_2 – 1 e CO_2 – 2 (número de repetições).

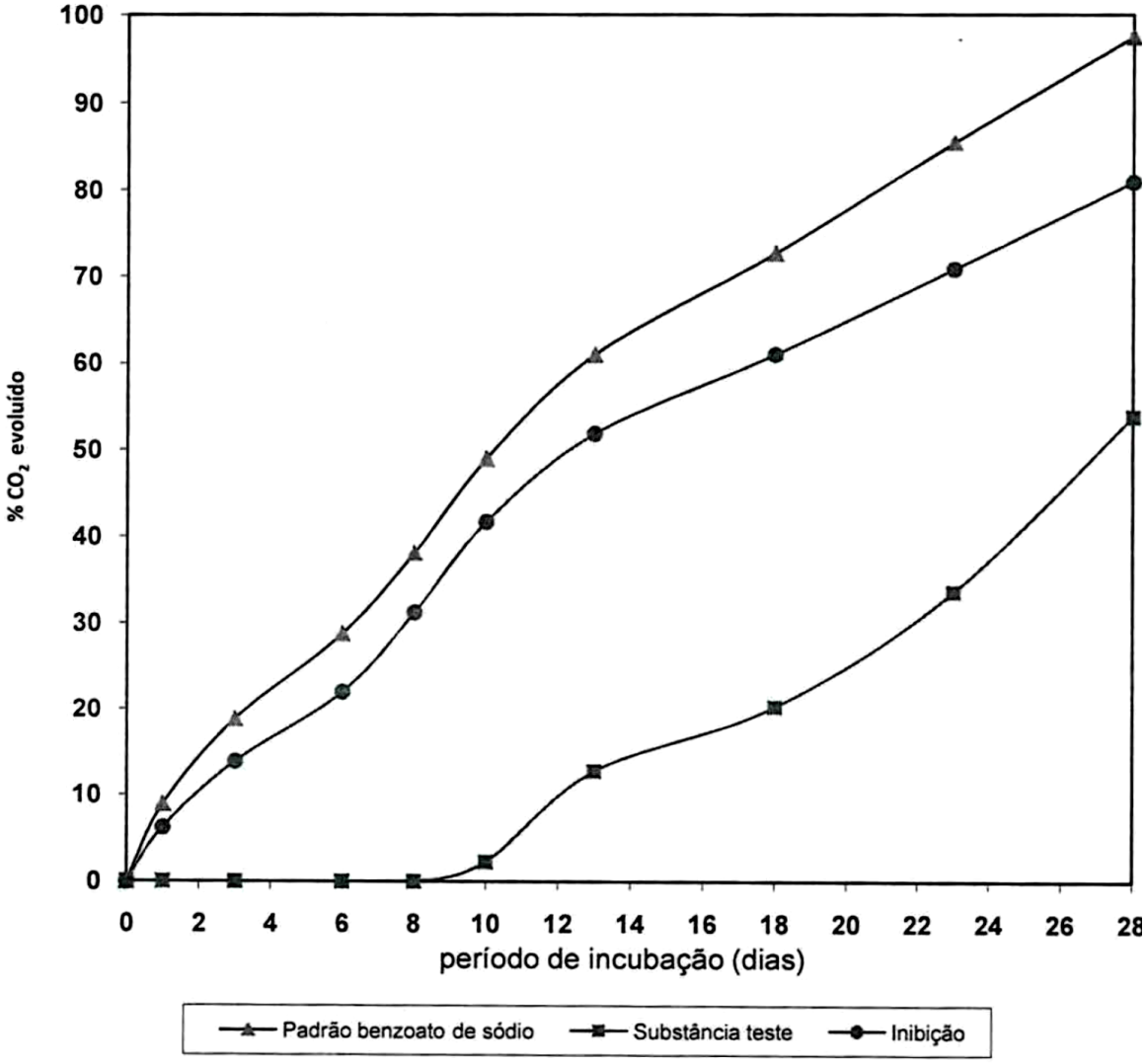


Figura 46: Porcentagem de CO_2 liberado na solução de benzoato de sódio (marcador triangular), na solução contendo a substância biolubrificante (marcador quadrado) e na solução de teste de inibição (mistura de benzoato de sódio e biolubrificante, indicada pela curva com marcador circular) em função do período de incubação em dias.

A liberação de CO_2 em decorrência da biodegradação do lubrificante começou a ser detectada já no 10º dia do teste (Figura 46 e Tabela 12). Ao final do 28° dia, o percentual de liberação de CO_2 das duplicatas variou entre 44,61% e 62,9%, sendo a média de 53,76% o percentual de biodegradação considerado. Além disso, o controle de inibição foi capaz de demonstrar que o biolubrificante não teve ação inibitória sobre os micro-organismos.

Não há parâmetros objetivos para definir um biolubrificante como ambientalmente amigável. Convenciona-se o termo que prontamente biodegradável, para classificar substâncias que atingem mais de 60% de biodegradação em testes de biodegradação imediata (BATTERSBY, 2005). No entanto, até mesmo materiais que não chegaram a este índice de 60% podem ser biodegradáveis em outras condições ou outro período de tempo. O lubrificante

derivado de biodiesel de soja e NPG apresentou boa porcentagem de biodegradação, e para aplicações nas quais a biodegradabilidade precise ser elevada, a mistura com outros óleos biodegradáveis pode ser uma alternativa. Os poliol ésteres, em geral, apresentam biodegradabilidade entre 46% e 80% (BATTERSBY, 2005). Cecutti e colaboradores obtiveram entre 79% e 93% de biodegradação para um lubrificante derivado de óleo de girassol no protocolo 301B (2008).

No mundo, estima-se que um sexto dos incidentes que envolvem poluição ambiental são envolvem óleos lubrificantes (LUNA et al., 2015). Mesmo após seu uso regular, pelo menos 36% dos lubrificantes utilizados no brasil vão acabar no meio ambiente, por dispensa de coleta ou despejos indevidos (SINDICOM, 2016). Entre países da União Europeia, este número é de cerca de 13%, chegando a 32% Nos Estados Unidos da América (NAGENDRAMMA; KAUL, 2012). Na Espanha, 40% da poluição dos rios é atribuída aos lubrificantes. A poluição por óleos lubrificantes é um problema global, provocado não só por vazamentos e derramamentos, mas também por características inerentes ao uso, como a evaporação. Alguns lubrificantes compostos por substâncias menos tóxicas e mais biodegradáveis tendem a ser menos arriscados ao meio ambiente (LUNA et al., 2015).

Nesse sentido, para iniciar e impulsionar o uso de produtos biodegradáveis, vários países vêm promovendo regulamentações obrigatórias e incentivos governamentais para o uso dos produtos acabados. Normativas como a EN13432, emitida pela União Europeia, cria normas específicas para o descarte de lubrificantes e condições mais favoráveis aos biolubrificantes. Individualmente, outras medidas vêm sendo tomadas. Portugal e Áustria iniciaram o incentivo aos biolubrificantes em 1991, e este último, juntamente com Alemanha e Suíça, proíbe o uso de óleos de base mineral em vias navegáveis e áreas florestais. Na França, é compulsório o uso de lubrificantes biodegradáveis em equipamentos de exploração em florestas (WHITBY, 2004). No Brasil, a RESOLUÇÃO CONAMA nº 362 dispõe sobre o recolhimento, a coleta e a destinação final de óleo lubrificante usado ou contaminado, (CONAMA, 2005), não fazendo distinção relativa à biodegradabilidade. Ainda assim, a substituição de óleos minerais pelos biolubrificantes reduz os problemas de contaminação ambiental, além de vantagens como a origem renovável da matéria-prima e o maior apelo público. Os óleos minerais possuem apenas 10% a 35% de biodegradação (MANG; DRESEL, 2007). Lubrificantes, quando em contato com o solo, podem torna-lo impróprio para a agricultura e para a construção civil, matando a vegetação e os micro-organismos (BART; GUCCIARDI; CAVALLARO, 2012a; WILLING, 2001).

6. CONCLUSÕES

1. O cultivo de *R. miehei* em torta de babaçu possibilitou a obtenção de um preparado enzimático sólido reprodutível com atividade de esterificação e hidrólise de 32 U/g e 40 U/g, respectivamente;

2. O preparado enzimático sólido foi capaz de catalisar a síntese de ésteres de neopentilglicol a partir de biodiesel de soja e o poliálcool NPG;

3. O desenvolvimento de uma metodologia de zimografia utilizando meios reacionais não aquosos mostrou-se viável como uma nova metodologia menos laboriosa para prospecção de catalisadores para síntese de biolubrificantes;

4. A síntese de ésteres de neopentilglicol pela enzima comercial de *Rhizomucor miehei* Lipozyme RM-IM atingiu resultados similares aos do PES, apresentando comportamento cinético semelhante e indicando a possibilidade de substituição da enzima comercial pelo PES nesta síntese;

5. No estudo do comportamento reacional, observou-se que a presença de água eleva o percentual de síntese quando comparada com reações sem água, com efeito ótimo a 2,5% (m/m), enquanto teores ligeiramente elevados influenciam negativamente a síntese por favorecer a hidrólise dos ésteres;

6. A síntese de ésteres de neopentilglicol por lipases de *R. miehei* parece ocorrer de duas formas: pela hidrólise seguida de transesterificação e pela transesterificação direta dos ésteres metílicos (alcoólise);

7. A síntese de ésteres de neopentilglicol mostrou-se estável quimicamente, uma vez que a condução por longos períodos não resultou na perda do produto;

8. Os ésteres de neopentilglicol apresentam características satisfatórias para aplicação como lubrificantes em motores industriais e automobilísticos;

9. A reutilização do PES apresenta melhores resultados quando o processo é conduzido em batelada alimentada do que em batelada simples, apresentando melhores percentuais de conversão ao longo dos reúsos;

10. As enzimas mostraram-se fortemente aderidas ao PES, mesmo após ciclos de reação e lavagens sucessivas, identificando-o como um catalisador estruturalmente estável em reações de transesterificação;

11. A condução do processo de síntese no modo de batelada alimentada foi capaz de induzir o consumo de ácidos graxos do meio reacional e de parte do biodiesel excedente na reação, alcançando níveis baixos de acidez (4%) e de ésteres metílicos (1,5%) no meio reacional;

12. O biolubrificante mostrou-se potencial de biodegradação aeróbia imediata de 53,67% em 28 dias;

13. A captação de interferogramas para monitoramento da síntese mostrou-se promissora, necessitando de investigações posteriores para avaliar a possibilidade de emprego desta metodologia de modo quantitativo ou qualitativo na síntese por transesterificação.

7. ETAPAS FUTURAS

Para continuidade da pesquisa, sugere-se:

- Sintetizar o biolubrificante em sistemas que recolham o metanol liberado durante as reações, permitindo o reaproveitamento do álcool e a biossegurança do processo;

- Avaliar a ecotoxicidade do biolubrificante, aplicando testes como o OECD 201, para avaliar seu impacto sobre o fitoplâncton;

- Avaliar o processo sintético em planta-piloto, permitindo avaliar o comportamento do sistema, as formas de escalonamento e a dinâmica de remoção enzimática e do produto;

- Realizar avaliação de viabilidade econômica para o processo;

- Avaliar a reutilização da enzima comercial RM-IM sem lavagem, tal qual experimentado com o PES, para fins comparativos;

- Complementar a caracterização físico-química dos biolubrificantes com ensaios de Perda por evaporação (NOACK) e de Corrosividade ao cobre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOVE. **Dados de produção e entrega de biodiesel no BrasilDados de produção e entrega de biodiesel no Brasil**. São Paulo: [s.n.]. Disponível em: <http://abiove.org.br/estatisticas/>. Acesso em: 2 mar. 2020.

ADACHI, D. et al. An integrative process model of enzymatic biodiesel production through ethanol fermentation of brown rice followed by lipase-catalyzed ethanolysis in a water-containing system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 52, n. 2, p. 118–122, 5 fev. 2013.

ADEWALE, P.; VITHANAGE, L. N.; CHRISTOPHER, L. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, v. 154, p. 81–91, 15 dez. 2017.

AFIDA, S. et al. BIODEGRADABILITY OF PALM-BASED LUBRICANTS. **Journal of Oil Palm Research**, v. 27, n. 4, p. 425–432, 2015.

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, E. C. G. **Produção de biodiesel por hidroesterificação e transesterificação do óleo ácido de macaúba (Acrocomia aculeata) utilizando lipases não comerciais.** [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2015.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Influence of the raw material on the final properties of biodiesel produced using lipase from Rhizomucor miehei grown on babassu cake as biocatalyst of esterification reactions. **Renewable Energy**, v. 113, p. 112–118, 1 dez. 2017.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable Energy**, v. 130, p. 574–581, 1 jan. 2019.

AGUIEIRAS, É. C. G. et al. Enzymatic synthesis of neopentyl glycol-bases biolubricants using biodiesel from soybean and castor bean as raw materials. **Renewable Energy**, v. 148, p. 689–696, 1 abr. 2020.

AGUIEIRAS, E. C. G.; CAVALCANTI-OLIVEIRA, E. D.; FREIRE, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**, v. 159, p. 52–67, nov. 2015.

ÅKERMAN, C. O. et al. Biolubricant synthesis using immobilised lipase: Process optimisation of trimethylolpropane oleate production. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 12, p. 2225–2231, dez. 2011.

ALEXANDRE, V. M. F. et al. Performance of anaerobic bioreactor treating fish-processing plant wastewater pre-hydrolyzed with a solid enzyme pool. **Renewable Energy**, v. 36, n. 12, p. 3439–3444, 1 dez. 2011.

ALVIM, J. C. et al. Biorrefinarias: Conceitos, classificação, matérias primas e produtos. **J. Bioen. Food Sci. Journal of Bioenergy and Food Science. Macapá**, v. 013, n. 3, p. 61–7761, 2014.

AMINI, Z. et al. State of the art and prospective of lipase-catalyzed transesterification reaction for biodiesel production. **Energy Conversion and Management**, v. 141, p. 339–353, 2017.

AMORIM, G. M. et al. Solid-state fermentation as a tool for methylxanthine reduction and simultaneous xylanase production in cocoa meal. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 11, p. 34–41, 1 jul. 2017.

ANDRADE, T. A.; ERRICO, M.; CHRISTENSEN, K. V. Influence of the reaction conditions on the enzyme catalyzed transesterification of castor oil: A possible step in biodiesel production. **Bioresource**

Technology, v. 243, p. 366–374, nov. 2017.

ANP. **Processamento de matérias-primas para produção de biodiesel**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/informacoes-de-mercado>.

ANP. **Mercado Brasileiro de Lubrificantes em 2019**. Brasília - DF: [s.n.]. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/arquivos/distribuicao-revenda/lubrificantes/anexo-unico-2020.xlsx>.

Application Brochures | Croda Lubricants. Disponível em: <https://www.crodalubricants.com/en-gb/technical-library/application-brochures>. Acesso em: 29 maio. 2020.

ASTM. **ASTM D974 - 14e2 - Standard Test Method for Acid and Base Number by Color-Indicator Titration**.

ASTM. **ASTM D2270 - 10(2016) Standard Practice for Calculating Viscosity Index from Kinematic Viscosity at 40 °C and 100 °C**. Disponível em: <https://www.astm.org/Standards/D2270>. Acesso em: 14 fev. 2020.

ASTM. ASTM D97-17b, Standard Test Method for Pour Point of Petroleum Products, ASTM International, West Conshohocken, PA, 2017, www.astm.org. 2017.

ASTM. **ASTM D445-19a, Standard Test Method for Kinematic Viscosity of Transparent and Opaque Liquids (and Calculation of Dynamic Viscosity)ASTM International**West Conshohocken, , 2019. Disponível em: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?D445-19a>. Acesso em: 14 fev. 2020

ASTM INTERNATIONAL. Standard Test Method for Oxidation Stability of Steam Turbine Oils by Rotating Pressure Vessel. **Book of Standards Volume: 05.01**, v. 05, p. 1–12, 2014.

ATTIA, N. K. et al. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, v. 271, p. 117578, 1 jul. 2020.

BAIN & COMPANY. **Potencial de Diversificação da Indústria Química Brasileira - Oleoquímicos**. Rio de Janeiro: [s.n.].

BAIN & COMPANY. **Potencial de Diversificação da Indústria Química Brasileira - Óleos lubrificantes**. Rio de Janeiro: [s.n.].

BART, J. C. J.; GUCCIARDI, E.; CAVALLARO, S. **Biolubricants: Science and Technology**. [s.l: s.n.].

BART, J. C. J.; GUCCIARDI, E.; CAVALLARO, S. **Biolubricants: Science and Technology**. Woodhead P ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2012b.

BART, J. C. J.; GUCCIARDI, E.; CAVALLARO, S. Principles of lubrication. In: **Biolubricants**. Cambridge: Elsevier, 2013a. p. 10–23.

BART, J. C. J.; GUCCIARDI, E.; CAVALLARO, S. Biolubricants. In: [s.l: s.n.]. p. 944.

BATTERSBY, N. S. Biodegradable Lubricants: What Does 'Biodegradable' Really Mean? **Journal of Synthetic Lubrication**, v. 22, n. 1, p. 3–18, 1 abr. 2005.

BELKISE DE FREITAS MOREIRA, F. **SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEO BÁSICO BIOLUBRIFICANTE A PARTIR DO BIODIESEL DE BABAÇU**. [s.l.] INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO CEARÁ, 2017.

BELTRÃO, N. E. DE M.; OLIVEIRA, M. I. P. DE. **Oleaginosas Potenciais do Nordeste para a Produção de Biodiesel**. Campina Grande: [s.n.]. Disponível em: <https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/277417/1/DOC177.pdf>. Acesso em: 13 dez. 2017.

BERAN, E. Application of waste carboxylic acids to the manufacture of biodegradable polyolester base

oils. **Journal of Synthetic Lubrication**, v. 18, n. 1, p. 39–50, 1 abr. 2001.

BLANK ROME LLC. **EPA's 2013 Vessel General Permit to Be Continued into 2019**. Disponível em: <https://www.blankrome.com/publications/epas-2013-vessel-general-permit-be-continued-2019>. Acesso em: 10 maio. 2020.

BRAND, D. et al. Microbial Degradation of Caffeine and Tannins from Coffee Husk. In: **Coffee Biotechnology and Quality**. [s.l.] Springer Netherlands, 2000. p. 393–400.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (Anacardium occidentale L.). **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, p. 902–908, out. 2007.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. Structure and molecular model refinement of Rhizomucor miehei triacyglyceride lipase: a case study of the use of simulated annealing in partial model refinement. **Acta Crystallographica Section B**, v. 48, n. 3, p. 307–319, 1992.

CAMMAROTA, M. C.; FREIRE, D. M. G. **A review on hydrolytic enzymes in the treatment of wastewater with high oil and grease contentBioresource Technology**Elsevier, , 1 nov. 2006.

CAMPANHOL, B. S. et al. Effect of the nutrient solution in the microbial production of citric acid from sugarcane bagasse and vinasse. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 19, 1 maio 2019.

CANET, A. et al. Lipase-catalysed transesterification: Viewpoint of the mechanism and influence of free fatty acids. **Biomass and Bioenergy**, v. 85, p. 94–99, fev. 2016.

CARRAZZA, L. R.; ÁVILA, J. C. C.; SILVA, M. L. DA. **Manual Tecnológico de Aproveitamento Integral do Fruto e da Folha do Babaçu (Attalea spp.)**. Brasília – DF: Instituto Sociedade, População e Natureza (ISPN), 2012.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with Aspergillus niger. **Bioresource Technology**, v. 71, n. 1, p. 45–50, 2000.

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.

CEC. Biodegradability of Two-stroke Cycle Outboard Engine Oils in Water: Approved Test Method CEC L-33-A-93. **Co-ordinating European Council for the Development of Performance Tests for Transportation Fuels, Lubricants and other Fluids.**, 1995.

CECUTTI, C.; AGIUS, D. Ecotoxicity and biodegradability in soil and aqueous media of lubricants used in forestry applications. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 17, p. 8492–8496, 1 nov. 2008.

CESARINI, S.; DIAZ, P.; NIELSEN, P. M. Exploring a new, soluble lipase for FAMEs production in water-containing systems using crude soybean oil as a feedstock. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 3, p. 484–487, 1 mar. 2013.

CHEIRSILP, B.; H-KITTIKUN, A.; LIMKATANYU, S. Impact of transesterification mechanisms on the kinetic modeling of biodiesel production by immobilized lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 42, n. 3, p. 261–269, 1 dez. 2008.

CHEN, B. et al. Candida antarctica Lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: Catalysts for polyester synthesis. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 2, p. 463–471, fev. 2008.

CHEN, J.-W.; WU, W.-T. Regeneration of immobilized Candida antarctica lipase for transesterification. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 95, n. 5, p. 466–469, 1 jan. 2003.

CHEN, J. et al. From ethyl biodiesel to biolubricants: Options for an Indian mustard integrated biorefinery toward a green and circular economy. **Industrial Crops and Products**, v. 137, p. 597–614, 1 out. 2019.

CHO, S. ???W; RHEE, J. S. Immobilization of lipase for effective interesterification of fats and oils in organic solvent. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 2, p. 204–210, 1993.

CLARK, J. H. et al. Circular economy design considerations for research and process development in the chemical sciences. **Green Chemistry**, v. 18, n. 14, p. 3914–3934, 11 jul. 2016.

COBLENTZ SOCIETY. **Neopentylglycol IR Spectrum**. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C126307&Units=SI&Mask=80#IR-Spec>. Acesso em: 12 mar. 2020.

COBLENTZ SOCIETY. **Water IR Spectrum**. Disponível em: <https://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C7732185&Units=SI&Type=IR-SPEC&Index=1#Refs>. Acesso em: 12 mar. 2020.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). A produtividade da soja: análise e perspectivas. **Compêndio de estudos Conab**, v. 10, p. 35, 2017.

CONAMA. Resolução. 362/2005. Publicada no DOU, n. 121, p. 128-130, de 23 de junho de 2005. p. 622–632, 2005.

CORTEZ, G. G.; MEIRA, D. M. Síntese, caracterização e avaliação catalítica de VOx/MgyAlOx na reação de decomposição do isopropanol. **Quimica Nova**, v. 31, n. 6, p. 1290–1295, 2008.

COSAN. **Relatório de Resultados - 1º Trimestre do Exercício Social de 2013 – Abril, Maio e Junho de 2012**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <http://ri.cosan.com.br/ptb/744/cartafinanceira1t13.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2017.

COSTA RODRIGUES, R. et al. Improved enzyme stability in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ethyl ester from soybean oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 152, n. 3, p. 394–404, 12 mar. 2009.

DA PENHA, M. P.; DA ROCHA LEÃO, M. H. M.; LEITE, S. G. F. Sugarcane bagasse as support for the production of coconut aroma by solid state fermentation (SSF). **BioResources**, v. 7, n. 2, p. 2366–2375, maio 2012.

DA SILVA, J. A. C. **Obtenção de um Lubrificante Biodegradável a partir de Ésteres do Biodiesel da Mamona via Catálise Enzimática e Estudos de Estabilidades Oxidativa e Térmica**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

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, 1 dez. 2015.

DA SILVA, J. A. C.; HABERT, A. C.; FREIRE, D. M. G. A potential biodegradable lubricant from castor biodiesel esters. **Lubrication Science**, v. 25, n. 1, p. 53–61, jan. 2013.

DE AZEREDO, L. A. I. et al. Production and Regulation of Lipase Activity from Penicillium restrictum in Submerged and Solid-State Fermentations. **Current Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 361–365, 24 maio 2007.

DE CARVALHO, C. C. C. R. **Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processesBiotechnology Advances**, 2011.

DE CASTRO, A. M. H. et al. Trichoderma harzianum IOC-4038: A promising strain for the production of a cellulolytic complex with significant β-glucosidase activity from sugarcane bagasse cellulignin. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 7, p. 2111–2122, 9 nov. 2010.

DE VRIJE, T. et al. The fungal biocontrol agent Coniothyrium minitans: Production by solid-state fermentation, application and marketing. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1–2, p. 58–68, 2001.

DEMIRBAS, A. Biorefineries: Current activities and future developments. **Energy Conversion and**

Management, v. 50, n. 11, p. 2782–2801, 2009.

DEREWENDA, U. et al. Catalysis at the Interface: The Anatomy of a Conformational Change in a Triglyceride Lipase. **Biochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1532–1541, 1992.

DERKSEN, J. T. P. Recent Developments in the Synthesis of Fatty Acid Derivatives. **JAOCS.**, p. 250, 1999.

DHAWANE, S. H. et al. Parametric optimization of biodiesel synthesis from rubber seed oil using iron doped carbon catalyst by Taguchi approach. **Renewable Energy**, v. 105, p. 616–624, 2017.

DHILLON, G. S. et al. Value-addition of agricultural wastes for augmented cellulase and xylanase production through solid-state tray fermentation employing mixed-culture of fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1160–1167, 1 jul. 2011.

DU, W.; WANG, L.; LIU, D. Improved methanol tolerance during Novozym435-mediated methanolysis of SODD for biodiesel production. **Green Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 173–176, 2007.

DUAN, G.; CHEN, J. Y. Effects of polar additives on the enzyme enantioselectivity of an esterification reaction in organic solvents. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 10, p. 1065–1068, out. 1994.

DUBÉ, M. A. et al. A comparison of attenuated total reflectance-FTIR spectroscopy and GPC for monitoring biodiesel production. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 81, n. 6, p. 599–603, 1 jun. 2004.

EMBRAPA. Tecnologias de Produção de Soja - Região Central do Brasil 2012 e 2013. **Sistemas de Produção**, p. 242, 2011.

ERHAN, S. Z.; ASADAUSKAS, S. Lubricant basestocks from vegetable oils. **Industrial Crops and Products**, v. 11, n. 2–3, p. 277–282, 2000.

EUROPEAN COMISSION. **EU Ecolabel - Environment - European Commission**. Disponível em: <https://ec.europa.eu/environment/ecolabel/>. Acesso em: 14 maio. 2020.

FERNANDES, M. L. M. et al. Esterification and transesterification reactions catalysed by addition of fermented solids to organic reaction media. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 1, p. 8–13, 2 jan. 2007.

FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic synthesis of biolubricants from by-product of soybean oil processing catalyzed by different biocatalysts of Candida rugosa lipase. **Catalysis Today**, abr. 2020.

FERREIRA, M. D. P.; DANIEL, L. P.; DE LIMA, J. E. O programa Brasileiro de biodiesel e o risco associado ao preço da mamona em Irecê, Bahia. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 53, n. 4, p. 667–682, 2015.

FOGLER, H. S. et al. **Cálculo de Reatores - O Essencial da Engenharia das Reações Químicas**. 1. ed. [s.l.] LTC, 2014.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G. H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. **The Journal of biological chemistry**, v. 226, n. 1, p. 497–509, maio 1957.

G. KNOTHE. ANALYTICAL METHODS USED IN THE PRODUCTION AND FUEL QUALITY ASSESSMENT OF BIODIESEL. **Transactions of the ASAE**, v. 44, n. 2, p. 193–200, 2001.

GAPINSKI, R. E.; JOESP, I. E.; LEYZELL, B. D. A Vegetable Oil Based Tractor Lubricant. **SAE Technical Paper Series**, n. 41 2, 1994.

GAULE, G. Comparison of hydraulic oils HEES and HEPR relative to applicability in the market. **Mineraloeltechnik**, v. 52, n. 6, p. 1–19, 2007.

GEIER, M. et al. Engineering Pichia pastoris for improved NADH regeneration: A novel chassis strain for whole-cell catalysis. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 11, p. 1741–1748, 2015.

GODOY, M. G. et al. Use of a low-cost methodology for biodetoxification of castor bean waste and lipase production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 44, n. 5, p. 317–322, 6 maio 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 and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945–953, ago. 2011a.

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 and Biotechnology**, v. 38, n. 8, p. 945–953, 16 ago. 2011b.

GOG, A. et al. Biodiesel production using enzymatic transesterification – Current state and perspectives. **Renewable Energy**, v. 39, n. 1, p. 10–16, 2012.

GOLDBERG, M. et al. Enzymatic ester synthesis with continuous measurement of water activity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Protein Structure and Molecular**, v. 957, n. 3, p. 359–362, 2 dez. 1988.

GOMBERT, A. K. et al. Lipase production by Penicillium restrictum in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 1–2, p. 85–90, out. 1999.

GRAND VIEW RESEARCH. **The Bio-lubricants Market during the forecast period of 2018-2023**. Disponível em: <https://www.industryarc.com/PressRelease/712/Biolubricants-Market-Research.html?gclid=EAIaIQobChMI6tC_86Pg6QIVChKRCh1O3gSuEAAYASAAEgK1sPD_BwE>. Acesso em: 10 maio. 2020.

GRESHAM, R. M.; TOTTEN, G. E.; SOCIETY OF TRIBOLOGISTS AND LUBRICATION ENGINEERS. **Lubrication and Maintenance of Industrial Machinery: Best Practices and Reliability**. [s.l.] CRC Press, 2009.

GRYGLEWICZ, S.; PIECHOCKI, W.; GRYGLEWICZ, G. Preparation of polyol esters based on vegetable and animal fats. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 1, p. 35–39, mar. 2003.

GUERRA, G. B. et al. **Processo para produção de ésteres e biolubrificantes, catalisado por sólido fermentado**BRAZIL, 2017. Disponível em: <https://patentimages.storage.googleapis.com/4c/69/b9/ad56dea28a959f/BR102017022583A2.pdf>

GUPTA, R. et al. **Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiologyProgress in Lipid Research**, 2015.

GUTARRA, M. L. E. et al. Lipase Production by Solid-State Fermentation. In: **Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals**. Totowa, NJ: Humana Press, 2005. p. 105–116.

GUTARRA, M. L. E. et al. Inoculum strategies for Penicillium simplicissimum lipase production by solid-state fermentation using a residue from the babassu oil industry. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 82, n. 3, p. 313–318, 2007.

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, n. 21, p. 5249–5254, 2009.

HALLING, P. J. Organic liquids and biocatalysts: theory and practice. **Trends in Biotechnology**, v. 7, n. 3, p. 50–52, 1 mar. 1989.

HAMA, S. et al. Use of mono- and diacylglycerol lipase as immobilized fungal whole cells to convert residual partial glycerides enzymatically into fatty acid methyl esters. **Journal of Molecular Catalysis**

B: Enzymatic, v. 58, n. 1–4, p. 93–97, jun. 2009.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HE, Z. et al. Study of the tribological behaviors of S, P-containing triazine derivatives as additives in rapeseed oil. **Wear**, v. 257, n. 3–4, p. 389–394, 2004.

HILL, K. Fats and Oils as Oleochemical Raw Materials. **Journal of Oleo Science**, v. 72, n. 7, p. 1255–1264, 2000.

HO, C. K.; MCAULEY, K. B.; PEPPLEY, B. A. **Biolubricants through renewable hydrocarbons: A perspective for new opportunitiesRenewable and Sustainable Energy Reviews**Elsevier Ltd, , 1 out. 2019. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032119304691>. Acesso em: 20 maio. 2020

HOLANDA, A. **Biodiesel e Inclusão Social**. Série cade ed. Brasília – DF: Coordenação de Publicações, 2004.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation--are there any biotechnological advantages? **Current opinion in microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–6, 2005.

HONARY, L. A. T.; RICHTER, E. **Biobased Lubricants and Greases: Technology and Products**. [s.l: s.n.].

HOUSTON, S. et al. **Soy protein-containing composition**, 17 set. 2006. Disponível em: <https://patents.google.com/patent/US20060062889A1/en>. Acesso em: 1 mar. 2020

INTERNATIONAL ENERGY AGENCY (IEA). **Technology Roadmap: Biofuels for Transport**. Paris: [s.n.]. Disponível em: <www.iea.org>. Acesso em: 13 dez. 2017.

IWASAKI, Y.; YAMANE, T. Enzymatic synthesis of structured lipids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1, p. 129–140, 2000.

JAEGER, K. E.; EGGERT, T. **Lipases for biotechnologyCurrent Opinion in Biotechnology**, 2002.

JIN, Z. et al. Combined utilization of lipase-displaying Pichia pastoris whole-cell biocatalysts to improve biodiesel production in co-solvent media. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 102–109, 1 fev. 2013.

JOHRI, S. et al. Purification and characterisation of an ester hydrolase from a strain of Arthrobacter species: Its application in asymmetrisation of 2-benzyl-1,3-propanediol acylates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 269–273, 1 fev. 2001.

JOSHI, C.; MATHUR, P.; KHARE, S. K. Degradation of phorbol esters by Pseudomonas aeruginosa PseA during solid-state fermentation of deoiled Jatropha curcas seed cake. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 7, p. 4815–4819, 1 abr. 2011.

KANIA, D. et al. **A review of biolubricants in drilling fluids: Recent research, performance, and applicationsJournal of Petroleum Science and Engineering**Elsevier, , 1 nov. 2015.

KOUTINAS, A.; KOOKOS, I. Special issue on advances on biorefinery engineering and food supply chain waste valorisation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 116, p. 1–2, 2016.

KUMAR, P. K. R.; LONSANE, B. K. Solid state fermentation: physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 145–148, 1990.

KWON, M. A. et al. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. **Biotechnology Letters**, v. 33, n. 4, p. 741–746, abr. 2011.

LANSDOWN, A. R. **Lubrication and Lubricant Selection: a Practical Guide**. [s.l.] Professional Engineering, 2003.

LANSDOWN, A. R.; LEE, S. Aviation lubricants. In: **Chemistry and Technology of Lubricants: Third Edition**. [s.l: s.n.]. p. 345–373.

LEAL, M. C. M. R. et al. Effect of enzymatic hydrolysis on anaerobic treatment of dairy wastewater. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1173–1178, 1 maio 2006.

LINKO, Y. Y. et al. Lipase biocatalysis in the production of esters. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 11, p. 1293–1299, 1995.

LONSANE, B. K. et al. Engineering aspects of solid state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, n. 6, p. 258–265, 1985.

LORENZI, H.; NOBLICK, L.; KAHN, F.; FERREIRA, E. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2010.

Lubricants. Disponível em: <https://www.basf.com/global/en/products/segments/industrial_solutions/performance_chemicals/business/fuel-and-lubricant-solutions/lubricants.html>. Acesso em: 20 maio. 2020.

LUNA, F. M. T. et al. Studies on biodegradability of bio-based lubricants. **Tribology International**, v. 92, p. 301–306, 8 ago. 2015.

LUZURIAGA, S.; MARIONI, M. The key market drivers of bio-lubricants. **Lube Magazine**, n. 143, p. 21–23, 2018.

MADEIRA, J. V.; MACEDO, J. A.; MACEDO, G. A. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using Paecilomyces variotii. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 15, p. 7343–7348, 1 ago. 2011.

MAHAMUNI, N. N.; ADEWUYI, Y. G. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) method to monitor soy biodiesel and soybean oil in transesterification reactions, petrodiesel- biodiesel blends, and blend adulteration with soy oil. **Energy and Fuels**, v. 23, n. 7, p. 3773–3782, 16 jul. 2009.

MANDARI, V.; NEMA, A.; DEVARAI, S. K. Sequential optimization and large scale production of lipase using tri-substrate mixture from Aspergillus niger MTCC 872 by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 89, p. 46–54, 1 fev. 2020.

MANG, T.; DRESEL, W. **Lubricants and Lubrication**. [s.l: s.n.].

MARKETS AND MARKETS. **The global bio-lubricants market size**. Disponível em: <https://www.wfmj.com/story/41912215/the-global-bio-lubricants-market-size-is-projected-to-reach-usd-336-billion-by-2022>. Acesso em: 15 maio. 2020.

MARTINS, P. F. et al. Free fatty acid separation from vegetable oil deodorizer distillate using molecular distillation process. **Separation and Purification Technology**, v. 48, n. 1, p. 78–84, 1 fev. 2006.

MITCHELL, D. A.; BEROVIČ, M.; KRIEGER, N. Solid-state fermentation bioreactor fundamentals: Introduction and overview. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**, p. 1–12, 2006.

MOBARAK, H. M. et al. **The prospects of biolubricants as alternatives in automotive applicationsRenewable and Sustainable Energy Reviews**, maio 2014.

MONTEIRO, M. R. et al. **Critical review on analytical methods for biodiesel characterizationTalanta**Elsevier, , 15 dez. 2008.

MÜLLER-ZERMINI, B. **Methods for Testing Biodegradation of Lubs**. Disponível em: <moz-extension://9e30b221-6faa-4fc0-bed4-e68942110209/enhanced-

reader.html?openApp&pdf=https%3A%2F%2Fwww.cectests.org%2Fpublic%2Finfo_%2Fg003%2Fcec10_2334_p.pdf>. Acesso em: 18 fev. 2020.

NAGENDRAMMA, P. Study of pentaerythritol tetraoleate ester as industrial gear oil. **Lubrication Science**, v. 23, n. 8, p. 355–362, 2011.

NAGENDRAMMA, P.; KAUL, S. Development of ecofriendly/biodegradable lubricants: An overview. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 1, p. 764–774, 2012.

NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1191–1195, 1996.

NOËL, M.; LOZANO, P.; COMBES, D. Polyhydric alcohol protective effect on Rhizomucor miehei lipase deactivation enhanced by pressure and temperature treatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 27, n. 6, p. 375–380, 2005.

NOUREDDINI, H.; GAO, X.; PHILKANA, R. S. Immobilized Pseudomonas cepacia lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 7, p. 769–777, maio 2005.

OECD. OECD 301 - Ready Biodegradability. **OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**, v. 301, n. July, p. 1–62, 1992.

OH, J. et al. Synthesis of biolubricants using sulfated zirconia catalysts. **Applied Catalysis A: General**, v. 455, p. 164–171, 30 mar. 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Solid-state fermentation of co-products from palm oil processing: Production of lipase and xylanase and effects on chemical composition. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 36, n. 5, p. 381–388, 3 set. 2018.

PLURAL-SINDICOM. **Anuário Plural-SINDICOM 2019**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://sindicom.com.br/index.php/download/anuario-2019-sindicom/>.

Products. Disponível em: <https://lexolube.com/in/Products>. Acesso em: 20 maio. 2020.

PROFITO, F. J. et al. Effect of lubricant viscosity and friction modifier on reciprocating tests. **SAE International**, p. 1–5, 2013.

RAHARDJO, Y. S. P.; TRAMPER, J.; RINZEMA, A. **Modeling conversion and transport phenomena in solid-state fermentation: A review and perspectivesBiotechnology Advances**, 2006.

RAMACHANDRAN, S. et al. Oil cakes and their biotechnological applications - A review. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 2000–2009, 1 jul. 2007.

RAMOS, L. P. et al. Biodiesel - um projeto de sustentabilidade econômica e sócio-ambiental para o Brasil. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 31, p. 28–37, 2003.

RAO, T. V. V. L. N. et al. **An overview of research on biolubricants in Malaysia and Japan for tribological applicationsJurnal Tribologi**. [s.l: s.n.].

REMONATTO, D. et al. FAME Production from Waste Oils Through Commercial Soluble Lipase Eversa® Catalysis. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 4, p. 254–262, 1 ago. 2016.

RODRIGUES, R. C. et al. Enzymatic synthesis of biodiesel from transesterification reactions of vegetable oils and short chain alcohols. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 85, n. 10, p. 925–930, 14 out. 2008.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from Thermomyces lanuginosus. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268–1273, 1 ago. 2010.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from Rhizomucor miehei as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1–2, p. 15–32, 2010.

RODRIGUEZ, J. A. et al. Novel chromatographic resolution of chiral diacylglycerols and analysis of the stereoselective hydrolysis of triacylglycerols by lipases. **Analytical Biochemistry**, v. 375, n. 2, p. 196–208, 2008.

ROSA, D. R. et al. Performance and molecular evaluation of an anaerobic system with suspended biomass for treating wastewater with high fat content after enzymatic hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 24, p. 6170–6176, 1 dez. 2009.

RUDNICK, L. **Synthetics, Mineral Oils, and Bio-Based Lubricants**. [s.l.] CRC Press, 2013. v. 20135638

RUEDA, N. et al. Reversible immobilization of lipases on heterofunctional octyl-Amino agarose beads prevents enzyme desorption. v. 21, n. 5, 1 maio 2016a.

RUEDA, N. et al. Chemical Modification in the Design of Immobilized Enzyme Biocatalysts: Drawbacks and Opportunities. v. 16, n. 3, p. 1436–1455, 1 jun. 2016b.

SALUM, T. F. C. et al. Synthesis of biodiesel in column fixed-bed bioreactor using the fermented solid produced by Burkholderia cepacia LTEB11. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1348–1354, 1 ago. 2010.

SANTOS, J. C. S. DOS et al. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of Enzymes. v. 7, n. 16, p. 2413–2432, 1 ago. 2015.

SANTOS, M. C. Estudo do Processo de Craqueamento do Óleo de Palma para Produção de Biocombustível. **Universidade Federal do Pará**, p. 241, 2015.

SCHNEIDER, V. E. et al. **Diagnóstico dos Resíduos Orgânicos do Setor Agrossilvopastoril e Agroindústrias Associadas**. Brasília - DF: [s.n.]. Disponível em: <http://www.ipea.gov.br/agencia/images/stories/PDFs/relatoriopesquisa/120917_relatorio_residuos_organicos.pdf>. Acesso em: 3 out. 2017.

SELWAL, M. K. et al. Tannase production by Penicillium atramentosum KM under SSF and its applications in wine clarification and tea cream solubilization. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 374–387, 2011.

SHAH, S. N. et al. Synthetic Methodologies of Ester-Based Eco-Friendly, Biodegradable Lubricant Base Stocks for Industrial Applications. In: **Environmentally Friendly and Biobased Lubricants**. [s.l.] CRC Press, 2016. p. 205–231.

SHARMA, B. K.; BIRESAW, G. **Environmentally friendly and biobased lubricants**. [s.l.] CRC Press, 2017.

SHIMADA, Y. et al. **Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processingJournal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, 2002.

SIATIS, N. G. et al. Improvement of biodiesel production based on the application of ultrasound: Monitoring of the procedure by FTIR spectroscopy. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 83, n. 1, p. 53–57, 1 jan. 2006.

SILVA, J. D. N. **Produção de Lipase por Fermentação em Estado Sólido Utilizando o Fungo Rhizomucor miehei**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

SILVA, J. N. et al. Impact of extraction parameters on the recovery of lipolytic activity from fermented babassu cake. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, 4 ago. 2014.

SINDICATO NACIONAL DAS EMPRESAS DISTRIBUIDORAS DE COMBUSTÍVEIS E

LUBRIFICANTES. **Combustíveis, Lubrificantes e Lojas de Conveniência**. Rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <http://www.sindopolis.com.br/wp-content/uploads/2016/07/ANUARIO_2016_TOTAL_FINAL2_WEB-1.pdf>. Acesso em: 30 nov. 2017.

SINDICOM. **Combustíveis, Lubrificantes & Lojas de Conveniência**. Disponível em: <http://www.sindicom.com.br/download/anuario_sindicom_2013_FINAL_revisado.pdf>. Acesso em: 11 dez. 2017.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES FLORESTAIS. Produção Florestal. . 2016.

SKOOG, D. et al. **Fundamentals of analytic chemistry**. [s.l.] Brooks/Cole Cengage Learning, 2014.

SUN, J. et al. Lipase-catalysed transesterification of coconut oil with fusel alcohols in a solvent-free system. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 89–94, set. 2012.

SZCZĘSNA ANTCZAK, M. et al. Enzymatic biodiesel synthesis – Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, n. 5, p. 1185–1194, 2009.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, n. 8, p. 492–497, 1988.

TALUKDER, M. M. R. et al. Novozym 435 for production of biodiesel from unrefined palm oil: Comparison of methanolysis methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 3–4, p. 106–112, 1 out. 2009.

TAPIZQUENT, M. et al. Zymography detection of a bacterial extracellular thermoalkaline esterase/lipase activity. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.] Humana Press Inc., 2017. v. 1626p. 295–300.

THOMAS, L.; LARROCHE, C.; PANDEY, A. **Current developments in solid-state fermentationBiochemical Engineering Journal**, 2013.

TOCCI, L. What does biodegradable really mean? **Lubes 'n' Greases**, v. 10, p. 40–43, 2004.

TRENTIN, C. M. et al. Enzyme-catalyzed production of biodiesel by ultrasound-assisted ethanolysis of soybean oil in solvent-free system. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 38, n. 3, p. 437–448, 26 fev. 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY; OFFICE OF WASTEWATER MANAGEMENT. Environmentally Acceptable Lubricants. 2011.

VALIVETY, R. H. et al. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 38, n. 10, p. 1137–1143, 5 dez. 1991.

VANDENBERGHE, L. P. S. et al. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by Aspergillus niger. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 2, p. 175–178, 1 set. 2000.

VAZ, S. J.; LAVIOLA, B. G.; ALVES, A. A. Matérias-primas oleaginosas para biorrefinarias. In: **Biorrefinarias: Cenários e perspectivas**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. p. 29–43.

VEERABHADRAPPA, M. B.; SHIVAKUMAR, S. B.; DEVAPPA, S. Solid-state fermentation of Jatropha seed cake for optimization of lipase, protease and detoxification of anti-nutrients in Jatropha seed cake using Aspergillus versicolor CJS-98. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 2, p. 208–214, 1 fev. 2014.

VELMURUGAN, R.; SREEDHAR, B.; SWAMINATHAN, M. Nanostructured AgBr loaded TiO 2: An efficient sunlight active photocatalyst for degradation of Reactive Red 120. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 46, 30 jul. 2011.

VILLENEUVE, P. Lipases in lipophilization reactions. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 6, p. 515–536, 10 nov. 2007.

VINIEGRA-GONZÁLEZ, G. et al. Advantages of fungal enzyme production in solid state over liquid fermentation systems. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 157–167, 2003.

VOLLHARDT, K. P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica: Estrutura e Função**. 6. ed. São Paulo: Bookman, 2013.

WANG, Y. et al. Production of biodiesel from waste cooking oil via a two-step catalyzed process and molecular distillation. **Energy and Fuels**, v. 24, n. 3, p. 2104–2108, 18 mar. 2010.

WATANABE, Y. et al. Production of FAME from acid oil model using immobilized Candida antarctica lipase. **JAOCS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 11, p. 825–831, nov. 2005.

WATANABE, Y. et al. Conversion of acid oil by-produced in vegetable oil refining to biodiesel fuel by immobilized Candida antarctica lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 44, n. 3–4, p. 99–105, 1 mar. 2007.

WHITBY, R. D. Will regulations help improve bio-lubricant market? **Tribology & Lubrication Technology**, v. 60, n. 3, p. 64, 2004.

WILLING, A. **Lubricants based on renewable resources - An environmentally compatible alternative to mineral oil products**. Chemosphere. **Anais**...2001

ZAGO, E. et al. Synthesis of ethylic esters for biodiesel purposes using lipases naturally immobilized in a fermented solid produced using rhizopus microsporus. **Energy and Fuels**, v. 28, n. 8, p. 5197–5203, 21 ago. 2014.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media. **The Journal of biological chemistry**, v. 263, n. 17, p. 8017–8021, 1988.

Fuel 177 (2016) 123–129

Contents lists available at ScienceDirect

Fuel

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fuel

Rapid determination of the synthetic activity of lipases/esterases via transesterification and esterification zymography

Jaqueline G. Duarte [a,1], Kassia Leone-Ignacio [a,1], Jose Andre C. da Silva [b], Roberto Fernandez-Lafuente [c], Denise M.G. Freire [a,*]

[a] Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Centro de Tecnologia, Bl. A, Sl. 549, Ilha do Fundão, 21949-900 Rio de Janeiro, Brazil
[b] Cenpes, Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello, Petrobras, Rio de Janeiro, Brazil
[c] Departamento de Biocatálisis, ICP-CSIC, C/Marie Curie 2, Campus UAM-CSIC, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

HIGHLIGHTS

- A new and versatile method to determine synthetic activity by zymography is proposed.
- Specific detection of proteins which perform the synthetic activity desired.
- Zymogram results are confirmed by titration, GC-analysis and NMR.
- This method may be applied for enzyme high-throughput screening.

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 October 2015
Received in revised form 17 February 2016
Accepted 26 February 2016
Available online 8 March 2016

Keywords:
Transesterification reactions
Zymography
Biodiesel
Lipase
Biolubricants

ABSTRACT

A new simple and extremely versatile zymography method based on transesterification and esterification reactions was developed in this work. The method consists in building a transesterification or esterification reaction medium according to the goal of the research. Since commercial enzymes and crude extracts commonly consist in *pools* of proteins, this methodology provides a means to determine which protein are responsible for the enzymatic activity desired. The protocol may be potentially used as a high-throughput screening of lipases or esterases that catalyzes the synthesis reaction for biodiesel and biolubricants production.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The environmental interest that surrounds the world leads to a chemistry (i.e. green chemistry) in which the enzymes may have special relevance. In this context, lipases (triacylglycerol acylhydrolases, EC 3.1.1.3) should be highlighted. *In vivo*, these enzymes catalyze triglycerides hydrolysis into free fatty acids and glycerol at the oil–water interface [1]. *In vitro*, and in the absence of water, several synthetic reactions can be catalyzed by lipases such as acidolysis, aminolysis, alcoholysis, esterification, transesterification and interesterification [2]. Synthetic reactions catalyzed by lipases, such as esterification and transesterification, have earned importance due to industrial applications of the bioproducts that come from then [3], such as biodiesel [4,5] or biolubricants [6].

Several studies have reported the industrial lipase applications for transesterification and esterification reactions [7–11] and also its enzymatic synthesis could obtain more successful results than chemical catalysis [12].

The polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) is very widespread to separate proteins by their electrophoretical mobility. Zymography comprises a rapid and practical method which applies this PAGE on detection of enzymes responsible for the desired activity [13]. Thus, its use presents some advantages such as: (a) reducing timeframe for obtaining results; (b) identify a desired enzyme activity among a pool of proteins/enzymes found in crude extracts from non-commercial and commercial sources.

Zymography has been largely used for detection of enzymes which play proteolytic reactions [13,14] and for lipases and

* Corresponding author. Tel.: +55 2139387361.
E-mail address: freire@iq.ufrj.br (D.M.G. Freire).
[1] Both authors have evenly contributed to this paper.

http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.02.079
0016-2361/© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

esterases detection in both hydrolytic [15], and less frequently in synthetic reactions [16]. This method is based on staining the protein band responsible for the desired activity usually by precipitation of a reaction product.

The use of this technique for detection of transesterification activity has not been reported until the present date. Thus, the aim of this work is to describe one new, quick, and simple method that allows the detection of enzymes able to catalyze transesterification reactions, such as the biodiesel and biolubricants production [7,12]. The methodology could be useful in high-throughput screening of lipases/esterases, permitting the identification of the enzyme/s that is/are the real responsible species for the detected activity, as this should be coupled to a protein band in the PAGE experiment, allowing even possible future identification, extraction and purification of specific lipases/esterases.

2. Material and methods

2.1. Materials

The pre-stained molecular weight SeeBlue® Plus 2 was obtained from Novex by Life Technologies (PMW). Lipase AY Amano 30 (AY) was purchased from Amano Enzyme Inc. (Japan). Lipozyme TL 100L (TL) was provided by Novozymes S/A (Denmark). Lipomod 34 MDP™ (MDP) was from Biocatalysts Inc. (UK) and Lipase from *Pseudomonas* sp. type XIII (XIII) was purchased from Sigma Aldrich.

An enzyme preparation previously reported by our group, obtained by solid-state fermentation of babassu cake using a mesophilic strain of *Rhizomucor miehei* (IDAC accession number 071113-01), has been also used. This enzyme preparation consists of a dry fermented solid (DFS) prepared as described by Aguieiras *et al.* [7]. The crude enzyme extract was obtained from DFS extraction with phosphate buffer (0.1 mol L^{-1}, pH 7.0) as described by Gombert *et al.* [17]. This extract was used in zymography assays. The oleic acid was purchased from VETEC, Sigma Aldrich (Brazil), the trimethylolpropane (TMP) from Sigma Aldrich (Brazil) and the methyl esters from castor oil (castor biodiesel esters) were provided by PETROBRAS (Rio de Janeiro, Brazil). All enzymes were diluted to an appropriated concentration according to their specific activity in 5 mM phosphate buffer, pH 7.0.

2.2. Methods

2.2.1. SDS–PAGE experiments

Enzyme samples at 4–10 μg/mL were loaded in 12 % running and 4 % stacking PAGE gels. Sample protein concentration was determined according to Bradford's method [18] to be diluted in Laemmli's sample-loading buffer [19] excluding β-mercaptoethanol and containing bromophenol blue and SDS. Then the sample was applied to the stacking gel, without boiling, aiming to be comparable with zymogram gels. The electrophoretic running gel was performed at 180 V at room temperature until the end of the running gel. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue to identify proteins bands. The negative controls (blank) were prepared by boiling the enzyme aliquots diluted in sample buffer for 30 min before being applied into the gels, respectively with analogous non boiled enzymes. The preparation of each gel was repeated at least five times, in order to secure the reliability and reproducibility of this methodology.

2.2.2. Zymography for the specific transesterification and esterification activity

The same SDS–PAGE procedures described above were performed without staining. All zymograms presented in this work were performed on partially denaturing condition after being subjected to the reactions preliminarily in both native and half-denaturing conditions. We tested the PAGE-native for all conditions (data not shown), but we chose the SDS–PAGE, due to the higher resolution of the bands. After the electrophoretic run, gels were soaked for SDS removal with 1 % Triton X-100 in 5 mM phosphate buffer pH 7.0, for 20 min. Subsequently, they were washed with distilled water and then re-equilibrated in 5 mM phosphate buffer pH 7.0 for 10 min. Finally, the gels were submerged in three different reaction media which were prepared according to the final activity desired. For esterification activity, the medium was composed of ethanol and oleic acid in a molar ratio of 1:1. For biolubricant reaction, the medium consisted of oleic acid and TMP, in 3:1 M ratio. The third reaction consists of biodiesel obtained by castor biodiesel esters and TMP in a molar ratio of 4.5:1 [12]. For all reaction medium, the substrates were blended together and the gels subjected to each reaction. They were left stirring in a shaker in these reaction mixtures at a minimum rotation (approximately 50 rpm) at 45 °C for 24 h when TMP is used for biolubricant reaction and 3 h in the case of ethanol for biodiesel reaction, however, the time can vary according to the enzyme activity. The reactions were carried out until the appearance of the product deposition. Subsequently, the gels were washed and conditioned with acetic acid 1 % until image acquisition.

2.2.3. Esterification and transesterification reaction in bioreactors

Esterification reactions were carried out in 20 mL bench-scale reactors magnetically stirred (200 rpm) and thermostatized at 45 °C. The reaction medium was composed of oleic acid and TMP in molar ratio of 3:1 and 0.1 % of the commercial lipases MDP e XIII (w/w). Esterification activity was determined by oleic acid consumption in the esterification reactions with TMP, measured by automatic titration using triplicate samples of 100 μL removed from the reaction medium, mixed with acetone/ethanol 1:1, and using NaOH 40 mM as titrating reagent with an end point pH at 11. The acid oleic conversion was expressed by percentual of oleic acid consumed, from difference between the acidity at the final and at the beginning of the reaction.

In order to confirm the biodiesel and biolubricants production showed in zymogram bands, esterification and transesterification reactions were performed as described above:

Esterifications reactions:

(a) oleic acid and ethanol (molar ratio 1:1) using 20 % (w/v) DFS and
(b) oleic acid and TMP (3:1) with commercial lipase 4 % (w/v) 34 MDP.

Transesterification reactions:

(c) castor biodiesel esters and TMP (4.5:1) utilizing commercial lipase 4 % (w/v) 34 MDP.

The same conditions described in Section 2.2.2 were used. The products of "a" were analyzed trough GC analysis and the products of "b" and "c" were submitted to NMR analysis.

2.2.4. Product identification by nuclear magnetic resonance

^{1}H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) was used to identify the structure and purity of synthesized compounds, using Agilent INOVA-300 (7,05T) spectrometer device. Samples were prepared in deuterated chloroform ($CDCl_3$) at 25 °C, at 5 % (1H) e 20 % ^{13}C concentration, and compared with pure chemical compounds spectra.

2.2.5. Product identification by gas chromatography

Gas Chromatography (CG) was used to analyze the fatty acid ethyl esters (FAEEs) content of the esterification reaction between oleic acid and ethanol. We used the same methodology described by Aguieiras *et al.* [7].

3. Results and discussion

3.1. Determination of transesterification and esterification activities by zymography

Fig. 1 shows that both commercial enzymes and crude extracts consist of a complex mixture of proteins. On transesterification and esterification zymograms, a white precipitate was obtained when the reaction occurred, corresponding to fatty acid esters formed by the enzyme-catalyzed reaction between fatty acids or esters and alcohols. This white precipitates (bands) are shown in black due to a digital color inversion, in order to improve the visualization. Thus, it was possible to identify the enzymes responsible for the synthetic activity of commercial preparations and DFS extract upon the target substrates (Figs. 2–4). The controls with denatured enzymes are shown in Fig. 5. Lipases and esterases with synthetic activities were thus detected in the polyacrylamide gels by the *in situ* precipitation of fatty acid esters formed by the enzyme-catalyzed esterification or transesterification reactions with fatty acid or ester and alcohol or polyalcohol. The white precipitates were water-insoluble, well-shaped and assuredly adhered, and could not be removed by washing in buffers or solvents such as hexane, chloroform, ethanol or Folsch reagent, even under sonication. Moreover, the removal was not possible by friction, showing the material was not adsorbed onto to the mesh, but was synthesized through the polyacrylamide network. In addition, stains or any other similar deposits were not observed throughout gel, discarding the possibility that the substrates would spontaneously precipitate. It assures the suitability of the method for such detection.

This method allows determining in a single step the band/s of protein/s that is/are responsible of the desired catalytic activity. The commercial lipase from *Pseudomonas* sp. Type XIII showed two major protein bands, one less than 64 kDa and another of about 20 kDa, and other four minor bands (Fig. 1, lane D). From this protein pool, these two major bands showed activity in the transesterification zymogram between castor biodiesel esters and TMP so as other two bands with high activity (Fig. 4, lane D). One of these proteins corresponds to a molecular weight slightly above 64 kDa and another has about 50 kDa. Therefore, this protocol indicates that these minority proteins could be interesting for one specific biotechnological process than the main components of the commercial extract.

The DFS crude extract (lane F) consists in a *pool* of proteins in which we may also have lipases or esterases [7]. The total crude enzyme extract contains many diffuse bands distributed along the gel lane (Fig. 1, lane F). Fig. 2 shows that only two bands (<36 kDa) are responsible for the reaction of oleic acid and ethanol (molar ratio 1:1).

The commercial enzyme Lipozyme TL 100L (lane E) presented one diffuse band (Fig. 1) of around 30 kDa that gave a significant activity as shown in Figs. 2 and 3, but also some other minor bands have some activity.

Amano 30 (lane B) and Lipomod™ 34MDP (lane C) are described as lipases derived from the yeast *Candida rugosa*. This yeast produces several isoforms of lipases around 60 kDa [20], corresponding to the main band of the preparation (Fig. 1, lanes B and C) as the band of major intensity. However, there are other minor bands showed in the same figure but only one of these bands was responsible for the activity showed in Figs. 3 and 4. This protein band has a molecular weight of around 40 kDa.

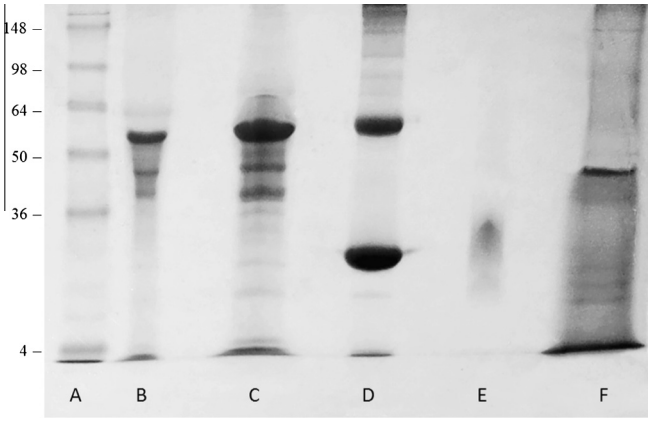


Fig. 1. SDS–PAGE of all commercial enzymes and crude extract. Lane A: Pre-stained molecular protein standard (MPS); Lane B: Lipase AY Amano 30 (AY); Lane C: Lipomod 34 MDP (MDP); Lane D: Lipase from *pseudomonas* sp. Type XIII (XIII); Lane E: Lipozyme TL (TL); Lane F: DFS crude enzyme extract obtained from extraction with phosphate buffer (DFS).

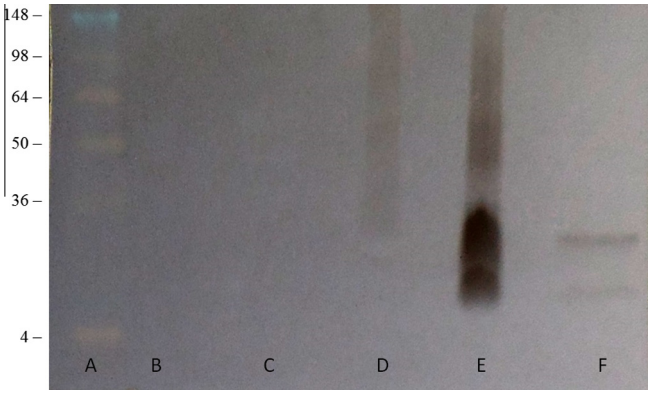


Fig. 2. Esterification zymogram of biodiesel production from the reaction of oleic acid:ethanol, molar ratio 1:1. Lane A: Pre-stained molecular protein standard (MPS); Lane B: Lipase AY Amano 30 (AY); Lane C: Lipomod 34 MDP (MDP); Lane D: Lipase from *pseudomonas* sp. Type XIII (XIII); Lane E: Lipozyme TL (TL); Lane F: DFS crude enzyme extract obtained from extraction with phosphate buffer (DFS).

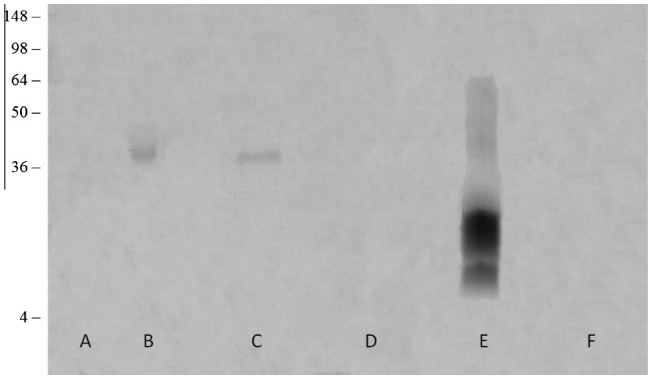


Fig. 3. Esterification zymogram of biolubricant production from the reaction of oleic acid: TMP, molar ratio 3:1. Lane A: Pre-stained molecular protein standard (MPS); Lane B: Lipase AY Amano 30 (AY); Lane C: Lipomod 34 MDP (MDP); Lane D: Lipase from *pseudomonas* sp. Type XIII (XIII); Lane E: Lipozyme TL (TL); Lane F: DFS crude enzyme extract obtained from extraction with phosphate buffer (DFS).

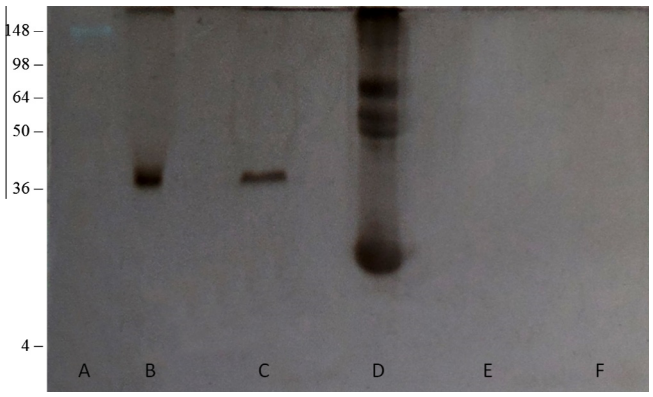


Fig. 4. Transesterification zymogram of biolubricant production from the reaction of castor biodiesel esters: TMP, molar ratio 4.5:1. Lane A: Pre-stained molecular protein standard (MPS); Lane B: Lipase AY Amano 30 (AY); Lane C: Lipomod 34 MDP (MDP); Lane D: Lipase from *Pseudomonas* sp. Type XIII (XIII); Lane E: Lipozyme TL (TL); Lane F: DFS crude enzyme extract obtained from extraction with phosphate buffer (DFS).

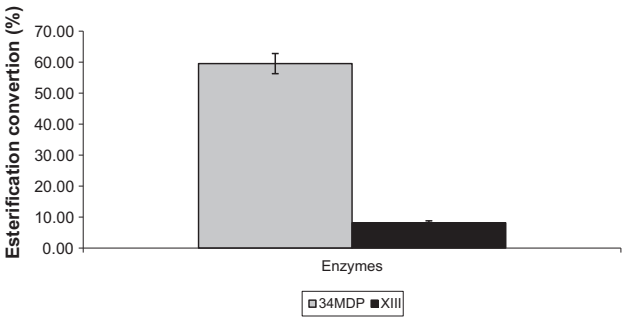


Fig. 6. Results of biolubricant esterification conversion from the reaction of oleic acid: TMP, molar ratio 3:1, with 34 MDP and XIII as a comparison of the results obtained in the corresponding zymogram and the real reaction.

Da Silva and colleagues [12] developed a biolubricant production from transesterification between castor biodiesel esters and TMP catalyzed by 34P (whose was discontinued and substituted by 34 MDP™ at Biocatalysts justifying its utilization at this work). Based on these results, we developed a zymogram transesterification to investigate the possibility of determine the specific bands of protein which are able to catalyze this biolubricant reaction. Zymography was performed applying the transesterification medium previously developed by them [12] and described in the Methods Section 2.2.2. The results were shown in Fig. 4. Only the enzymes AY (Lane B), 34 MDP (Lane C) and XIII (Lane D) presented bands with white precipitate, indicating a high potential of these enzymes to produce trimethylolpropane esters.

The production of superior alcohol esters with lubricating properties via enzymatic processes has been increasingly studied, as well as the biodiesel production [10–12,21]. In this context, we developed a procedure to detect enzymatic biolubricants

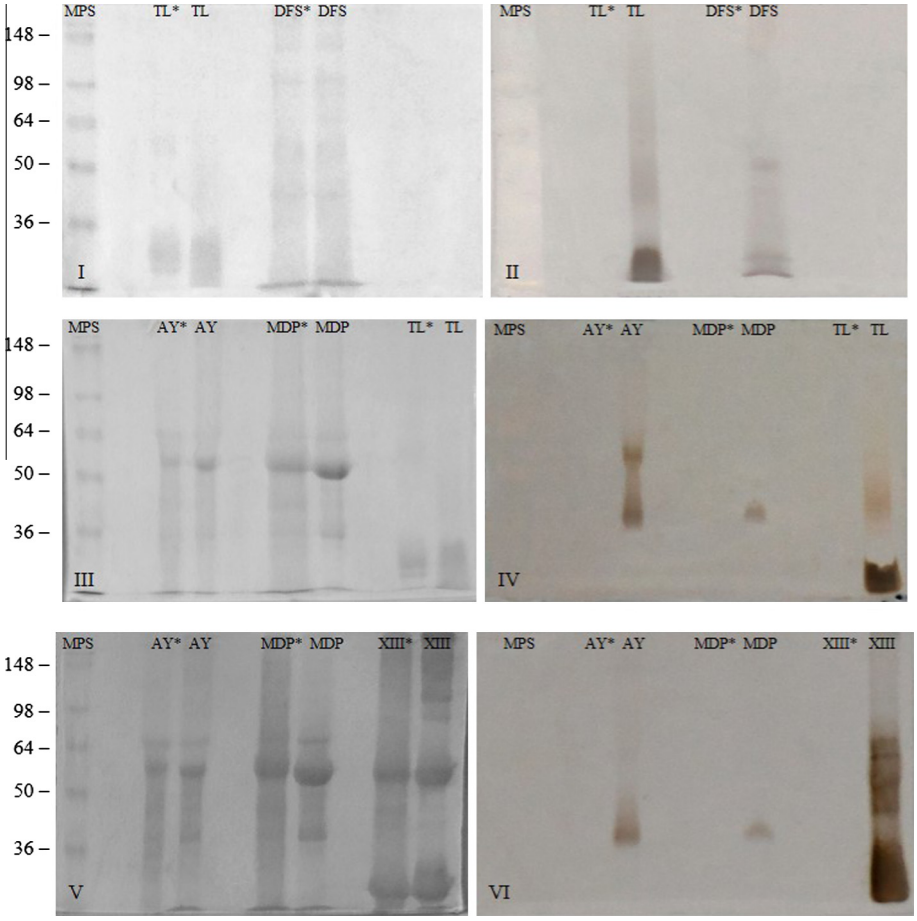


Fig. 5. This picture shows both SDS–PAGE (I, III and V) and the negative control (blank) zymogram (II, IV and VI) of the enzyme reactions shown previously. All gels have negative (*) and positive controls in paired lanes. The blank was prepared as described in material and methods Section 2.2.1. Gels I and II: oleic acid and ethanol (1:1); Gels III and IV: oleic acid and TMP (3:1); gels V and VI: castor biodiesel esters with TMP (4.5:1). For all zymogram reactions, the negative control lane has no activity whereas the positive lane exhibits the activity bands of enzymes.

production by zymography using oleic acid and TMP as substrates, because of their worldwide access and large use in literature for the biolubricants production [10,11,22]. The results can be seen in Fig. 3 presenting positive activity of AY, 34MDP and TL commercial enzymes in transesterification between oleic acid and TMP. However the first two enzymes did not show synthetic activity over oleic acid and ethanol (Fig. 2). In addition, the same two enzymes presented transesterification activity when the substrate was the castor biodiesel esters (Fig. 4).

The enzyme XIII, who formed products in the castor biodiesel esters reaction (Fig. 4), gave a negative result with oleic acid as substrate (Figs. 2 and 3). In parallel, the TL commercial preparation showed activity for the oleic acid (Figs. 2 and 3), but did not show activity when the substrate was castor biodiesel esters (Fig. 4). The diversity of results for the reactions highlights the need to apply a specific test for each enzyme activity, based on reactions and applications of interest.

Thus, it is possible to indicate which protein bands are more active or those ones are lipases or esterases indeed, and also, whose protein band will have more affinity for a specific substrate. It has great importance since commercial enzymes commonly consists of a pool of proteins, whose their activities are measured as hydrolytic activity upon classical and robust substrates in the literature, such as olive oil and p-nitrophenyl laurate. Thus, this measurement activity is for reference only, since it will change depending on the substrate offered. Moreover, activity of a commercial pool frequently is not attributed to any particular protein.

3.2. Bench reactor reactions for biodiesel and biolubricants production

The results of the reactions described in Section 2.2.3 can be seen in Fig. 6, Tables 1 and 2 and supplementary material. It can be observed that the protein 34MDP converted approximately 60 % of fatty acids while the enzyme XIII converted about 5 %, which agrees with the results found in the zymography gel showed in Fig. 3.

The reaction of oleic acid and ethanol was submitted to GC analysis and was observed the formation of 65.5 % of the product ethyl oleate. The reactions of oleic acid and TMP as well as castor biodiesel esters and TMP, were submitted to NMR analysis and the

Table 1
NMR results for oleic acid and TMP reaction (molar ratio 3:1). This reaction was carried out in triplicates at the same conditions of the zymogram observed in Fig. 3. The results have shown the formation of products from the substrates used.

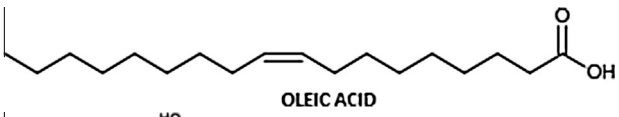
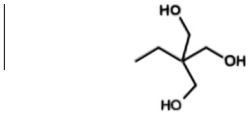
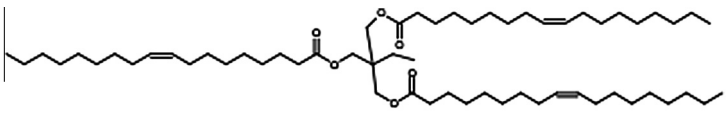
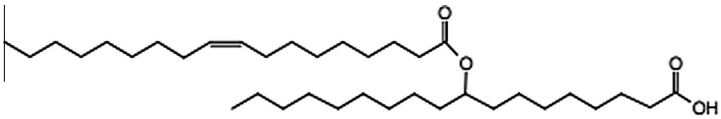
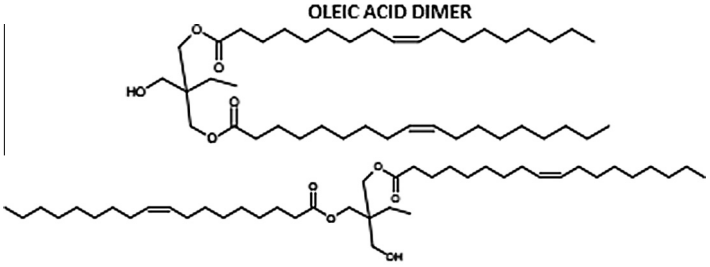
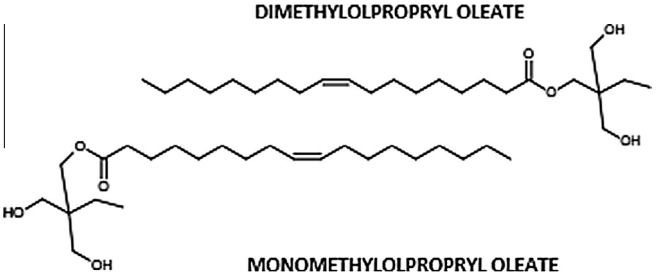
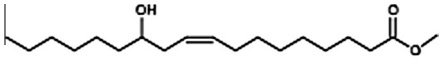
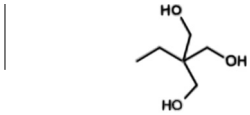
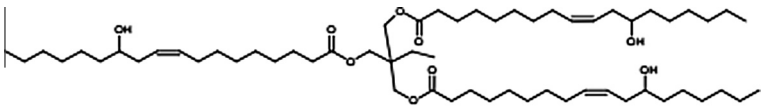
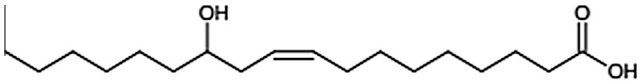
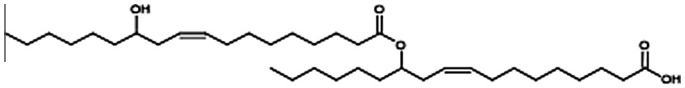
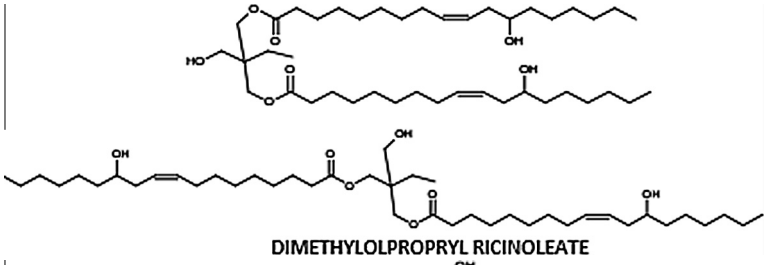
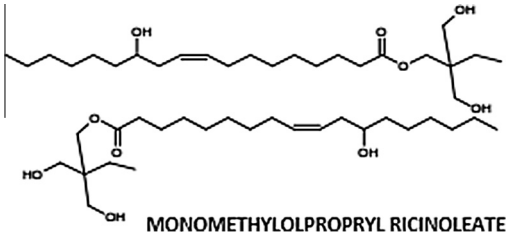
	Compound	Molar (%)	Weight (%)
Reaction substrates	 OLEIC ACID	18.5	6.8
	 TRIMETHYLOLPROPANE	0	0
Possible products for the reaction between oleic acid with TMP (molar ratio 3:1)	 TRIMETHYLOLPROPYL OLEATE	66.0	79.7
	 OLEIC ACID DIMER	0	0
	 DIMETHYLOLPROPRYL OLEATE	15.6	13.5
	 MONOMETHYLOLPROPRYL OLEATE	0	0

Table 2
NMR results for castor biodiesel esters and TMP reaction (molar ratio 4.5:1). This reaction was carried out in triplicates at the same conditions of the zymogram observed in Fig. 4. The results have shown the formation of products from the substrates used.

	Compound	Molar (%)	Weight (%)
Reaction substrates	 METHYL RICINOLEATE	50.6	32.8
	 TRIMETHYLOLPROPANE	0	0
Possible products for the reaction between castor biodiesel esters with TMP (molar ratio 4.5:1)	 TRIMETHYLOLPROPYL RICINOLEATE	17.8	36
	METHANOL	0	0
	 RICINOLEIC ACID	14.3	8.9
	 RICINOLEIC ACID DIMER	6.7	8
	 DIMETHYLOLPROPRYL RICINOLEATE	9.1	13.1
	 MONOMETHYLOLPROPRYL RICINOLEATE	1.4	1.2

results can be seen at Tables 1 and 2, respectively. Besides the remaining substrates it is possible to see the conversion in all reactions. These results indicate the white precipitates visualized in the corresponding enzymatic bands are representatives of the products formation at the gel matrix, once the background is still translucent during the reaction. This result also indicates that the enzyme 34MDP is effectively capable to convert the substrates in biolubricants as well as the DFS is able to produce biodiesel [7].

4. Conclusions

The methodology proposed in this work is a new simple and extremely versatile zymography method based on transesterification and esterification reactions. This new methodology is being useful to determine in a *pool* of several proteins the ones responsible for the synthetic activity required whose many times are not the main protein of the commercial or non-commercial extracts. Despite of this, this protocol may be potentially used as a high-throughput screening of enzymes – lipases and esterases – that catalyzes the reaction for biodiesel or biolubricant production. Thus, this paper presents a new alternative process optimization, allowing trying the best method according to the biotechnology application in question.

Acknowledgements

The authors thank CNPq – Brazil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PVE Project from CNPq, CAPES – Brazil (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), FAPERJ – Brazil (Fundação Carlos Chagas Filho de Apoio à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) and Petrobras – Brazil, ANP – Brazil, MCTI – Brazil and FINEP – Brazil for scholarships and financial support. R. Fernandez-Lafuente thanks MINECO of Spanish Government, by the grant CTQ2013-41507-R. The help and suggestions from Dr. Joab Sousa (Universidade Federal do Rio de Janeiro) and Dr. Ángel Berenguer (Universidad de Alicante) are gratefully recognized.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at http://dx.doi.org/10.1016/j.fuel.2016.02.079.

References

[1] Feng X, Patterson DA, Balaban M, Emanuelsson EAC. Characterization of tributyrin hydrolysis by immobilized lipase on woollen cloth using conventional batch and novel spinning cloth disc reactor. Chem Eng Res Des 2013;91:1684–92.

[2] Saxena RK, Sheoran A, Giri B, Davidson WS. Purification strategies for microbial lipases. J Microbiol Methods 2003;52:1–18.

[3] Stergiou PY, Foukis A, Filippou M, Koukouritaki M, Parapouli M, Theodorou LG, et al. Advances in lipase-catalysed esterification reactions. Biotechnol Adv 2013;31:1846–59.

[4] Guldhe A, Singh B, Mutanda T, Permaul K, Bux F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: novel and sustainable approaches. Renew Sustain Energy Rev 2015;41:1447–64.

[5] Aguieiras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, Freire DMG. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. Fuel 2015;159:52–67.

[6] Syaima MTS, Ong KH, Noor IM, Zamratul MIM, Brahim SA. The synthesis of biolubricant based oil by hydrolysis and non-catalytic of palm oil mill effluent (POME) using lipase. Renew Sustain Energy Rev 2015;44:669–75.

[7] Aguieiras ECG, Cavalcanti-Oliveira ED, Castro AM, Langone MAP, Freire DMG. Biodiesel production from *Acrocomia aculeata* acid oil by (enzyme/enzyme) hydroesterification process: use of vegetable lipase and fermented solid as low-cost biocatalysts. Fuel 2014;135:315–21.

[8] Kuo CH, Chen GJ, Chen CI, Liu YC, Shieh CJ. Kinetics and optimization of lipase-catalyzed synthesis of rose fragrance 2-phenylethyl acetate through transesterification. Process Biochem 2014;49:437–44.

[9] Liu M, Niu S, Lu C, Cheng S. An optimization study on transesterification catalyzed by the activated carbide slag through the response surface methodology. Energy Convers Manage 2015;92:498–506.

[10] Akerman CO, Gaber Y, Ghani NA, Lamsa M, Hatti-Kaul R. Clean synthesis of biolubricants for low temperature applications using heterogeneous catalysts. J Mol Catal B Enzym 2011;72:263–9.

[11] Åkerman CO, Hagströma AEV, Mollaahmada MA, Karlssonb S, Hatti-Kaul R. Biolubricant synthesis using immobilised lipase: process optimisation of trimethylolpropane oleate production. Process Biochem 2011;46:2225–31.

[12] Da Silva JAC, Soares VF, Fernandez-Lafuente R, Habert AC, Freire DMG. Enzymatic production and characterization of potential biolubricants from castor bean biodiesel. J Mol Catal B: Enzym http://dx.doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.09.017.

[13] Paech C, Christianson T, Maurer KH. Zymogram of proteases made with developed film from nondenaturing polyacrylamide gels after electrophoresis. Anal Biochem 1993;208:249–54.

[14] García-Tejedor A, Sánchez-Rivera L, Isidra R, Salom JB, Manzanares P. Dairy Debaryomyces hansenii strains produce the antihypertensive casein-derived peptides LHLPLP and HLPLP. Food Sci Technol 2015;61(2):550–6.

[15] Johri S, Verma V, Parshard R, Koul S, Taneja SC, Qazi GN. Purification and characterization of an ester hydrolase from a strain of *Arthrobacter* species: its application in asymmetrisation of 2-benzyl-1,3-propanediol acrylates. Bioorg Med Chem 2001;9:269–73.

[16] Kwon MA, Kim HS, Hahm DH, Song JK. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. Biotechnol Lett 2011;33:741–6.

[17] Gombert AK, Pinto AL, Castilho LR, Freire DMG. Lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state fermentation using babassu oil cake as substrate. Process Biochem 1999;35:85–9.

[18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976;72:248–54.

[19] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 1970;227(5259):680–5. 15.

[20] Trbojević JN, Dimitrijević AS, Veličković DV, Gavrović-Jankulović M, Milosavić NB. Isolation of *Candida rugosa* lipase isoforms. Hem Ind 2013;67:703–6.

[21] Malhotra D, Mukherjee J, Gupta MN. Lipase catalysed tansesterification of castor oil by straight chain higher alcohols. J Biosci Bioeng 2015;119:280–3.

[22] Cavalcante IM, Rocha NRC, Maier ME, De Lima APD, Andrade-Neto DM, De Brito DHA, et al. Synthesis and characterization of new esters of oleic acid and glycerol analogues as potential lubricants. Ind Crops Prod 2014;62:453–9.

16/033

INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

20/10/2017 870170080039 10:13

3158861707938385

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 022583 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: PETRÓLEO BRASILEIRO S.A. - PETROBRAS
Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ: 33000167000101
Nacionalidade: Brasileira
Qualificação Jurídica: Pessoa Jurídica
Endereço: AV. REPÚBLICA DO CHILE, N.65, CENTRO
Cidade: Rio de Janeiro
Estado: RJ
CEP: 20031912
País: Brasil
Telefone: 2162-6020
Fax:
Email: intellectualproperty@petrobras.com.br

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/10/2017 às 10:13, Petição 870170080039

Depositante 2 de 2

Nome ou Razão Social:	UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO - UFRJ
Tipo de Pessoa:	Pessoa Jurídica
CPF/CNPJ:	33663683000116
Nacionalidade:	Brasileira
Qualificação Jurídica:	Instituição de Ensino e Pesquisa
Endereço:	Av. Brigadeiro Trompowski, S/Nº - Ilha do Fundão
Cidade:	Rio de Janeiro
Estado:	RJ
CEP:	21941-590
País:	BRASIL
Telefone:	
Fax:	
Email:	

Dados do Pedido

Natureza Patente:	10 - Patente de Invenção (PI)
Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):	PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES E BIOLUBRIFICANTES, CATALISADO POR SÓLIDO FERMENTADO
Resumo:	A presente invenção se refere a um processo para produção de ésteres compreendendo a reação de biodiesel metílico ou ácidos graxos livres com um álcool polihidroxilado, na presença de um biocatalisador, o qual é um sólido fermentado contendo lipases de Rhizomucor miehei produzido pelo cultivo do microrganismo em rejeito agroindustrial por fermentação em estado sólido.
Figura a publicar:	Sim

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: José Vicente Perroni Pereira

Numero OAB: 127342

Numero API:

CPF/CNPJ:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

Telefone:

Fax:

Email: vicenteperroni@petrobras.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 8

Nome: GUILHERME BRANDÃO GUERRA

CPF: 09425169748

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 2 de 8

Nome: DENISE MARIA GUIMARÃES FREIRE

CPF: 74908880778

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 3 de 8

Nome: ERIKA CRISTINA GONÇALVES AGUIEIRAS

CPF: 10837034710

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 4 de 8

Nome: ELISA D'AVILA CAVALCANTI OLIVEIRA

CPF: 09224665721

Nacionalidade

Qualificação Física

Endereço

Cidade

Estado

CEP

País

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 5 de 8

Nome: JAQUELINE GRECO DUARTE

CPF: 12375315782

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 6 de 8

Nome: KASSIA LEONE IGNACIO

CPF: 11149120770

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 7 de 8

Nome: VALÉRIA FERREIRA SOARES

CPF: 50498959791

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Inventor 8 de 8

Nome: PRISCILA RUFINO DA SILVA

CPF: 12583280708

Nacionalidade:

Qualificação Física:

Endereço:

Cidade:

Estado:

CEP:

País:

Telefone:

Fax:

Email:

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Relatório Descritivo	NI 16_033 - 09 10 2017 - Relatorio Descritivo .pdf
Reivindicação	NI 16_033 - 09 10 2017 - Reivindicacao.pdf
Resumo	NI 16_033 - 09 10 2017 - Resumo.pdf
Desenho	NI 16_033 - Figuras Sandra.pdf
Procuração	Procuracao UFRJ 16_033 171017.pdf
Procuração	SUBSTABELECIMENTO PETROBRAS.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	NI 16_033 - GRU 3158861707938385.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

☑ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

☑ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PETICIONAMENTO ELETRÔNICO Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 20/10/2017 às 10:13, Petição 870170080039

“PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES E BIOLUBRIFICANTES, CATALISADO POR SÓLIDO FERMENTADO”

CAMPO DA INVENÇÃO

[0001] A presente invenção está relacionada ao campo da biocatálise. Mais especificamente, a presente invenção está relacionada ao desenvolvimento de novas rotas biocatalíticas que ampliam as possibilidades de obtenção, pela via enzimática, de ésteres que podem ser empregados como biolubrificantes.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[0002] Os óleos básicos são os principais constituintes de óleos lubrificantes e podem ser classificados em minerais (obtidos por destilação e refino do petróleo) e sintéticos (obtidos a partir de reações químicas de insumos provenientes da indústria petroquímica). Apesar de somente uma pequena parcela do consumo de petróleo ser na produção de lubrificantes, uma grande porcentagem desses produtos não é descartada de forma adequada, representando, assim, uma ameaça ao meio ambiente. A título exemplificativo, é importante considerar que o vazamento de um litro de lubrificante mineral pode contaminar $1x10^6$ litros de água.

[0003] Os requisitos cada vez mais restritos impostos por legislações ambientais, como a norma europeia EN13432, a exigência de lubrificantes de grau alimentício para as indústrias do ramo em determinados países e questões relacionadas à disponibilidade limitada dos recursos fósseis, têm contribuído para o desenvolvimento de produtos derivados de fontes alternativas, e constitui uma das principais prioridades do setor oleoquímico.

[0004] Os biolubrificantes são lubrificantes biodegradáveis, que podem ser decompostos por ação microbiana, obtidos, em geral, a partir de óleos vegetais modificados via reações químicas e são utilizados em aplicações onde a possibilidade de vazamentos possa comprometer o meio ambiente.

[0005] Em geral, biodegradabilidade significa a tendência de um lubrificante ser metabolizado por microrganismos em até um ano. A forma pela qual os microrganismos realizam a decomposição depende essencialmente se suas estruturas. Os óleos vegetais são tipicamente 99% biodegradáveis, caindo, usualmente, para 90% a 98% após a mistura com aditivos.

[0006] Os principais tipos de ésteres utilizados como biolubrificantes são diésteres, ftalatos, trimetilatos, C36 dimeratos e ésteres de poliol ou poliolésteres. Os poliolésteres são produzidos na reação entre álcoois poli-hídricos e ácidos mono ou dicarboxílicos. Essa classe de produto oferece extraordinária estabilidade devido à ausência de um hidrogênio secundário na posição β e à presença de um átomo central de carbono quaternário.

[0007] A reação empregada na produção de ésteres úteis como biolubrificantes catalisada por catalisadores químicos é conhecida no estado da técnica.

[0008] O documento BR 10 2013 033582 7 descreve a produção de biolubrificantes a partir de reações de transesterificação do biodiesel do óleo de mamona com álcool trimetilolpropano catalisadas por dibutildilaurato de estanho (DBTDL). Observa-se que as condições de reação, com o uso do DBTDL são extremas, exigindo temperaturas entre 168ºC e 172ºC e vácuo.

[0009] Catalisadores enzimáticos, ou biocatalisadores, apresentam diversas vantagens em comparação com catalisadores químicos. Entre elas, pode-se citar a alta seletividade das enzimas por seus substratos, altos rendimentos, condições mais brandas de reação, como temperatura e pressão, a não degradação de equipamentos e a biodegradabilidade do biocatalisador, por exemplo.

[00010] Todavia, o alto custo das preparações enzimáticas comerciais disponíveis no mercado tem sido impeditivo para a viabilidade econômica da sua aplicação industrial na síntese de produtos de menor valor agregado e de elevado volume de vendas.

[00011] A utilização de enzimas na forma de sólidos fermentados, produzidas por fermentação em estado sólido, representa uma alternativa de redução dos custos de produção, uma vez que etapas de extração e purificação da enzima são eliminadas.

[00012] O documento de patente PI0704791-6 refere-se a um processo de síntese de ésteres, para uso como biodiesel, que emprega reações catalisadas por lipases na forma de sólido fermentado, produzidas por fermentação no estado sólido, pela bactéria *Burkholderia cepacia*.

[00013] No processo do referido documento da técnica, ácidos graxos (no caso de reações de esterificação) ou uma fonte de triglicerídeos (no caso de reações de transesterificação) são reagidos com um álcool monohidroxilado, o qual é preferencialmente álcool etílico. O documento, além de usar enzima de origem bacteriana, não prevê reações de transesterificação e hidroesterificação empregando um álcool polihidroxilado.

[00014] É possível inferir que, até o presente momento, não foi descrito no estado da técnica um processo para obtenção de ésteres biolubrificantes que utilize reações de transesterificação e hidroesterificação empregando um álcool polihidroxilado, catalisado por sólidos fermentados obtidos por cultivo de microrganismos em rejeitos agroindustriais.

[00015] A presente invenção, empregando a utilização de lipases de baixo custo, contribui para a viabilidade econômica de produção de biolubrificantes por via enzimática, bem como a valorização da biomassa.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[00016] A presente invenção tem por objetivo prover um processo para produção de ésteres que solucione os principais problemas do estado da técnica listados anteriormente.

[00017] De forma a alcançar esse objetivo, a presente invenção provê um processo para produção de ésteres que envolve a reação de biodiesel metílico ou ácidos graxos livres (AGL) com um álcool polihidroxilado na presença de um biocatalisador, em que o biocatalisador é um sólido fermentado produzido pelo cultivo de um microrganismo em rejeito agroindustrial, por fermentação em estado sólido.

[00018] Outro objetivo da presente invenção é direcionado ao uso dos ésteres produzidos como biolubrificantes.

[00019] Outro objetivo da presente invenção é direcionado aos biolubrificantes compreendendo os ésteres produzidos pelo processo da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[00020] A Figura 1 representa a síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de soja e álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases de *R. miehei* presentes no sólido fermentado de torta de babaçu.

[00021] A Figura 2 mostra o reuso do sólido fermentado de torta de babaçu na síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de soja e álcool neopentilglicol.

[00022] A Figura 3 representa a síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de mamona e álcool trimetilolpropano catalisada pelas lipases de *R. miehei* presentes no sólido fermentado de torta de babaçu.

[00023] A Figura 4 representa a síntese de biolubrificante a partir da reação entre biodiesel de mamona e álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases de *R. miehei* presentes no sólido fermentado de torta de algodão.

[00024] A Figura 5 representa a síntese de biolubrificante a partir da reação entre os ácidos graxos livres de mamona e álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases de *R. miehei* presentes no sólido fermentado de torta de algodão.

[00025] A Figura 6 representa a síntese de biolubrificante a partir da reação entre os ácidos graxos livres de soja e álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases de *R. miehei* presentes no sólido fermentado de torta de algodão.

[00026] A Figura 7 representa a atividade do sólido fermentado (PES) de torta de babaçu, após várias reutilizações, sem lavagem com solvente, na síntese de biolubrificantes.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00027] A não ser que sejam definidos de maneira diferente, todos os termos técnicos e científicos aqui utilizados têm o mesmo significado entendido por um técnico no assunto ao qual a invenção pertence. A terminologia utilizada na descrição da invenção tem finalidade de descrever concretizações particulares somente, e não tem a intenção de limitar o escopo dos ensinamentos. A não ser que seja indicado de forma diferente, todos os números expressando quantidades, porcentagens e proporções, e outros valores numéricos usados no relatório descritivo e nas reivindicações, devem ser entendidos como sendo modificados, em todos os casos, pelo termo “cerca de”. Assim, a não ser que seja indicado o contrário, os parâmetros numéricos mostrados no relatório descritivo e nas reivindicações são aproximações que podem variar, dependendo das propriedades a serem obtidas.

[00028] Os presentes inventores solucionaram o problema do estado da técnica provendo um processo para produção de ésteres que compreende

reagir biodiesel metílico ou ácidos graxos livres com um álcool polihidroxilado, na presença de um biocatalisador, em que o biocatalisador é um sólido fermentado, produzido pelo cultivo de um microrganismo em rejeito agroindustrial por fermentação em estado sólido.

[00029] Em um primeiro aspecto, a presente invenção envolve a produção de lipases de baixo custo para uso na síntese de ésteres biolubrificantes. Para este fim, rejeitos agroindustriais são utilizados como meio de cultivo do processo de fermentação em estado sólido.

[00030] A fermentação em estado sólido possibilita o uso de matérias-primas de baixo custo como meio de cultivo de microrganismos, tendo um meio de fermentação simples. Nesse processo, os substratos fornecem não apenas nutrientes para a cultura dos microrganismos, mas servem como suporte para o crescimento das células.

[00031] No contexto da presente invenção, o termo “rejeito(s) agroindustrial(is)” deve ser entendido como resíduos sólidos (tortas) de matérias-primas oleaginosas. Preferivelmente, são utilizados resíduos sólidos da extração dos óleos de babaçu e algodão.

[00032] O termo “inóculo” deve ser entendido como células de microrganismo, na forma de esporos ou de células vegetativas, utilizadas para iniciar o processo de fermentação. Preferivelmente, o microrganismo é um fungo filamentoso. Mais preferivelmente, o fungo é do gênero *Rhizomucor*. Ainda mais preferivelmente, o fungo é da espécie *Rhizomucor miehei*.

[00033] O termo “fermentador” deve ser entendido como uma câmara com temperatura e umidade controladas para que haja o desenvolvimento do microrganismo sobre as tortas.

[00034] O termo “sólido fermentado” deve ser entendido como a torta fermentada e seca ao final do processo de fermentação em estado sólido contendo a biomassa do microrganismo e lipases.

[00035] Em uma concretização, à torta de babaçu ou de algodão, substrato para a fermentação em estado sólido, é adicionada água na proporção ideal para o processo fermentativo e, em seguida, o inóculo é misturado.

[00036] A torta umedecida e inoculada é, então, incubada no fermentador, durante o qual o microrganismo cresce e, como resultado do seu metabolismo, produz um conjunto de lipases com alta capacidade de síntese.

[00037] Ao final da fermentação em estado sólido, a torta fermentada é submetida a uma etapa de secagem antes de ser empregada na catálise das reações. Preferivelmente, a secagem é realizada por liofilização ou por aeração forçada.

[00038] O biocatalisador enzimático de baixo custo produzido pelo processo de fermentação em estado sólido é utilizado em reações de transesterificação ou hidroesterificação para produção dos ésteres biolubrificantes.

[00039] No processo de transesterificação, biodieseis metílicos são reagidos com álcoois polihidroxilados produzindo os ésteres biolubrificantes. Preferencialmente, o biodiesel metílico é biodiesel metílico de soja ou de mamona. Preferencialmente, o álcool polihidroxilado é neopentilglicol, trimetilolpropano ou pentaeritritol.

[00040] Em uma concretização, a reação de transesterificação é realizada na razão molar biodiesel:álcool de 2 a 5 e opcionalmente 1 a 3% (m/m) de água. O sólido fermentado é empregado como biocatalisador na concentração de 10 a 30% (m/m). A reação é conduzida no reator, sob agitação, na temperatura de 30 a 50°C, sob pressão atmosférica.

[00041] Em uma concretização preferida, o reator utilizado é um tanque com agitação, temperatura controlada, à pressão atmosférica, onde ocorre a reação de transesterificação.

[00042] Nestas condições, ésteres metílicos são transesterificados com o álcool produzindo os ésteres biolubrificantes e metanol como subproduto. O referido produto é separado ao final do processo.

[00043] O processo de hidroesterificação é composto por uma primeira reação de hidrólise e uma segunda, de esterificação.

[00044] Em uma concretização, a primeira reação (hidrólise) compreende a mistura de um óleo de oleaginosa e um tampão, na proporção de 1:1 volume/volume, seguido da adição de uma lipase na proporção de 1 a 2% m/v da massa de óleo.

[00045] A reação é conduzida no reator sob agitação, na temperatura de 30 a 40°C, sob pressão atmosférica. Nestas condições, o óleo é hidrolisado e são produzidos os ácidos graxos livres e a glicerol como subprodutos. Os ácidos graxos livres são separados do tampão, do glicerol e da lipase antes de serem utilizados na reação de esterificação.

[00046] Em uma concretização preferida, o óleo de oleaginosa é óleo de soja ou de mamona e a lipase é uma lipase comercial de *Candida rugosa* ou lipases obtidas de sementes dormentes de mamona.

[00047] Em uma concretização preferida, o reator utilizado é um tanque com agitação, temperatura controlada, à pressão atmosférica, onde ocorre a reação de hidrólise.

[00048] Em uma concretização, a segunda reação (esterificação) é conduzida pela mistura de ácidos graxos livres e um álcool polihidroxilado poliálcool, na razão molar ácidos graxos livres:álcool de 2 a 5 e opcionalmente 1 a 3% (m/m) de água. O sólido fermentado é empregado como biocatalisador na concentração de 10 a 30% (m/m). A reação é conduzida no reator sob agitação, na temperatura de 30 a 50°C, sob pressão atmosférica.

[00049] Em uma concretização preferida, o reator utilizado é um tanque com agitação, temperatura controlada, à pressão atmosférica, onde ocorre a reação de esterificação.

[00050] Nessas condições, os ácidos graxos livres são esterificados com o poliálcool produzindo os ésteres biolubrificantes e água como subproduto.

[00051] Os ésteres biolubrificantes obtidos pelo processo da presente invenção foram analisados quanto a suas propriedades físico-químicas, apresentando características físico-químicas satisfatórias em linha com os biolubrificantes atualmente disponíveis.

[00052] A viscosidade dos biolubrificantes é a propriedade mais importante desses fluidos, pois está relacionada diretamente à formação da película que protegerá as superfícies metálicas de ataques.

[00053] O índice de viscosidade é um parâmetro para o comportamento da viscosidade à temperatura de óleos. Quanto maior for o valor, menor as alterações de viscosidade do óleo com mudanças de temperatura. Normalmente, o valor do índice de viscosidade é determinado através de

cálculos que levam em consideração a viscosidade do produto a 40ºC e a 100ºC.

[00054] O ponto de fluidez mede a temperatura mínima na qual o óleo ainda flui e é um ensaio utilizado para avaliar o comportamento dos óleos lubrificantes quando submetidos a baixas temperaturas.

[00055] Propriedades físico-químicas como viscosidade, índice de viscosidade e ponto de fluidez dos biolubrificantes são superiores quando comparadas aos lubrificantes de base mineral.

[00056] As propriedades e desempenho dos biolubrificantes da presente invenção podem ainda ser melhorados pelo uso de aditivos que sejam compatíveis com os lubrificantes e, preferencialmente, que sejam não tóxicos e biodegradáveis.

[00057] Os ésteres produzidos pelo processo da presente invenção são especialmente úteis em aplicações lubrificantes em que as máximas temperaturas de operação sejam inferiores a 120ºC, porém, nas quais a temperatura ambiente permaneça acima de -40ºC.

[00058] Os biolubrificantes da presente invenção podem ser usados como óleo de motor, fluido hidráulico, fluido de laminação, entre outros.

[00059] A presente invenção será ainda ilustrada pelos seguintes exemplos, que não devem ser considerados como limitantes. Como ficará evidente para qualquer técnico no assunto, a invenção não está limitada a essas concretizações particulares.

EXEMPLOS

Exemplo 1 – Produção do sólido fermentado

[00060] O sólido fermentado de *Rhizomucor miehei* foi obtido a partir da fermentação das tortas de algodão (moída) ou de babaçu (moída e peneirada – partículas com tamanho inferior a 1,18 mm). As fermentações foram conduzidas em béqueres contendo 15g de torta com umidade ajustada para 65 e 50%, para as tortas de babaçu e de algodão, respectivamente. Cada béquer contendo a torta foi esterilizado a 121°C por 15 minutos em autoclave e a torta foi inoculada com 10^7 esporos de *R. miehei* por grama de sólido (peso seco) e incubada a 30°C em câmara climática com umidade relativa de 90%, por 72h. Ao final da fermentação, o meio fermentado foi liofilizado e estocado a 4°C até

utilização. Foram obtidos sólidos fermentados de *R. miehei* por fermentação em estado sólido utilizando torta de babaçu ou torta de algodão como matérias-primas, com atividade hidrolítica de 17 ± 2 U/g e 29 ± 1 U/g, respectivamente.

Exemplo 2 – Atividade hidrolítica

[00061] A atividade hidrolítica do sólido fermentado foi estimada mediante a variação de absorvância em espectrofotômetro promovida pela hidrólise do substrato p-nitrofenil laurato (p-NFL) na concentração de 25 mM em solução de acetonitrila/dimetilsulfóxido (DMSO) 1:1. Para a reação de hidrólise do substrato, uma alíquota de 250 µL da solução de p-NFL foi diluída em 2,2 mL de tampão fosfato de sódio pH 7,0 (25 mM) em cubeta, que foi aclimatada a 30ºC por 2 minutos. Após esse tempo, foi adicionada uma alíquota de 50µL do extrato enzimático líquido e a absorvância foi acompanhada no espectrofotômetro (SHIMADZU UV-1800) a 412 nm. Uma unidade enzimática (U) corresponde à quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de p-nitrofenol por minuto, nas condições de ensaio. O cálculo da atividade é realizado utilizando a Equação 1:

$$Atividade\ (U/mL) = \frac{\alpha \times D \times f \times V_f}{V_s}$$

(Equação 1)

onde:

α = variação de absorvância (∆Abs) no intervalo de tempo Δt (em minutos) transcorrido durante a fase de aumento linear da absorvância;

D = diluição da solução enzimática;

f = fator de conversão (0,094 µmol.L-1), obtido através da construção de uma curva padrão do p-NFL em concentração variando entre 0,01 e 0,2 µmol.mL-1;

Vf = volume reacional, que é o volume da solução de p-NFL em tampão e o volume da amostra (mL);

Vs = volume da solução enzimática utilizada no ensaio (mL).

[00062] A atividade hidrolítica expressa por grama de torta seca (U/g) foi calculada pela Equação 2:

$$Atividade\ (U/g) = \frac{(U/mL) \times V_t}{m}$$

(Equação 2)

onde:

Vt = volume de tampão utilizado na extração da enzima;

m = massa seca de torta.

Exemplo 3 – Reação de transesterificação

Exemplo 3.1 – Biodiesel de soja e álcool neopentilglicol

[00063] A reação entre biodiesel de soja e o álcool neopentilglicol resultou em um produto com conversão de 85,5% após 48h de reação catalisada pelo sólido fermentado de *R. miehei* produzido em torta de babaçu.

[00064] A reação do biodiesel de soja com o álcool neopentilglicol se deu na razão molar de 2:1 a 3,1:1 o álcool/biodiesel, 10 a 30% (m/m) de biocatalisador, com teor de água de 1 a 2,5% (m/m) e temperatura de 35 a 50°C sob agitação e pressão atmosférica (Figura 1).

[00065] O produto da reação entre biodiesel de soja e o álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de torta de babaçu foi produzido em maior volume (200 ml) e caracterizado, a fim de conhecer as propriedades do biolubrificante gerado (Tabela 1). Com exceção do índice de acidez, todas as outras propriedades avaliadas foram satisfatórias.

Tabela 1: Características do biolubrificante gerado na reação entre biodiesel de soja e o álcool neopentilglicol.

Ensaio	Resultado
Umidade (ppm)	884,4
Viscosidade 100ºC (mm^2/s)	4,290
Viscosidade 40ºC (mm^2/s)	15,41
Índice de viscosidade	206
Fluidez (ºC)	-6
Índice de acidez (mgKOH/g)	19,8
Bomba rotatória (min)	30

[00066] O sólido fermentado de torta de babaçu foi avaliado com relação ao reuso nas reações entre biodiesel de soja e neopentilglicol. Ao final de 24h ou

72h de reação, a enzima foi lavada com solvente (hexano ou etanol) seguido de filtração em funil de Büchner e incubação *overnight* em dessecador. Ao final desse procedimento, a enzima foi utilizada novamente na reação como descrito no exemplo 1. O sólido fermentado de torta de babaçu pôde ser reutilizado ao menos uma vez após lavagem com hexano ou etanol (Figura 2). A reutilização sem lavagem com solvente também foi testada. Neste caso, o produto, após um progresso reacional de 72h, foi removido pelo topo do reator após a decantação do sólido fermentado. Em seguida, um meio reacional novo foi adicionado ao reator, em massa equivalente à massa de produto retirada (Figura 7).

Exemplo 3.2 – Biodiesel de mamona e álcoois trimetilolpropano e pentaeritritol

[00067] A reação entre biodiesel de mamona e os álcoois trimetilolpropano e pentaeritritol resultou em um produto com conversão de 52% em 72h, respectivamente. As reações foram conduzidas com sólido fermentado de *R. miehei* produzido em torta de babaçu como biocatalisador.

[00068] A reação do biodiesel de mamona com álcoois trimetilolpropano e pentaeritritol se deu na razão molar de 2 a 3,75:1 álcool/biodiesel, 10 a 30% (m/m) de biocatalisador, com teor de água de 1 a 3% (m/m) e temperatura de 30 a 50°C sob agitação e pressão atmosférica (Figura 3).

Exemplo 3.3 – Biodiesel de mamona e álcool neopentilglicol

[00069] A reação entre biodiesel de mamona e o álcool neopentilglicol resultou em um produto com conversão de 91% em 96h. As reações foram conduzidas com sólido fermentado de *R. miehei* produzido em torta de algodão como biocatalisador.

[00070] A reação de biodiesel de mamona com álcool neopentilglicol se deu na razão molar de 2 a 4:1 álcool/biodiesel, 10 a 30% (m/m) de biocatalisador, com teor de água de 1 a 3% (m/m) e temperatura de 30 a 50°C sob agitação e pressão atmosférica (Figura 4).

[00071] O produto da reação entre o biodiesel de mamona a e o álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases do sólido fermentado de torta de babaçu foi produzido em maior volume (200 ml) e caracterizado, a fim de conhecer as propriedades do biolubrificante gerado (Tabela 2). Com exceção do índice de acidez, as outras propriedades foram satisfatórias.

Tabela 2: Características do biolubrificante gerado na reação entre biodiesel de mamona e o álcool neopentilglicol.

Ensaio	Resultado
Umidade (ppm)	541,9
Viscosidade 100ºC (mm^2/s)	86,57
Viscosidade 40ºC (mm^2/s)	8,854
Índice de viscosidade	66
Fluidez (ºC)	-39
Índice de acidez (mgKOH/g)	87,5
Bomba rotatória (min)	29
Rancimat (h)	6,5

[00072] O sólido fermentado de torta de algodão foi avaliado com relação ao reuso nas reações entre biodiesel de mamona e neopentilglicol. Ao final de 24h de reação, a enzima foi lavada com solvente (éter etílico ou etanol) seguido de filtração em funil de Büchner e incubação *overnight* em dessecador. Ao final desse procedimento, a enzima foi utilizada novamente na reação como descrito acima. O PES de algodão pôde ser reutilizado ao menos uma vez após lavagem com éter ou etanol.

Exemplo 4 - Reações de hidroesterificação

Exemplo 4.1 – ácidos graxos livres (AGLs) de mamona e o álcool neopentilglicol

[00073] A reação entre AGLs de mamona e o álcool neopentilglicol resultou em um produto com conversão de 65% em 96h. As reações foram conduzidas com sólido fermentado de *R. miehei* produzido em torta de algodão como biocatalisador.

[00074] A reação de AGLs de mamona com álcool neopentilglicol se deu na razão molar de 2 a 4:1 álcool/AGLs, 10 a 30% (m/m) de biocatalisador, com teor de água de 1 a 3% (m/m) e temperatura de 30 a 50°C sob agitação e pressão atmosférica (Figura 5).

[00075] O produto da reação entre os AGLs de mamona e o álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases do PES de algodão foi produzido em maior volume (200 ml) e caracterizado, a fim de conhecer as propriedades do

biolubrificante gerado (Tabela 3). Com exceção do índice de acidez, todas as outras propriedades avaliadas foram satisfatórias.

Tabela 3: Características do biolubrificante gerado na reação entre AGLs de mamona e o álcool neopentilglicol.

Ensaio	Resultado
Umidade (ppm)	873,5
Viscosidade 100ºC (mm^2/s)	152,2
Viscosidade 40ºC (mm^2/s)	13,04
Índice de viscosidade	73
Fluidez (ºC)	-33
Índice de acidez (mgKOH/g)	100,4
Bomba rotatória (min)	42
Rancimat (h)	114,5

Exemplo 4.2 – Ácidos Graxos Livres (AGLs) de soja a e o álcool neopentilglicol

[00076] A reação entre os AGLs de soja e o álcool neopentilglicol resultou em um produto com conversão de 82% em 72h. As reações foram conduzidas com sólido fermentado de *R. miehei* produzido em torta de algodão como biocatalisador.

[00077] A reação de AGLs de soja com álcool neopentilglicol se deu na razão molar de 2 a 4:1 álcool/AGLs, 10 a 30% (m/m) de biocatalisador, com teor de água de 1 a 3% (m/m) e temperatura de 30 a 50°C sob agitação e pressão atmosférica (Figura 6).

[00078] O produto da reação entre os AGLs de soja a e o álcool neopentilglicol catalisada pelas lipases do PES de algodão foi produzido em maior volume (200 mL) e caracterizado, a fim de conhecer as propriedades do biolubrificante gerado (Tabela 4). Com exceção do índice de acidez, fluidez e da umidade, todas as outras propriedades avaliadas foram satisfatórias.

Tabela 4: Características do biolubrificante gerado na reação entre AGLs de soja e o álcool neopentilglicol.

Ensaio	Resultado
Umidade (ppm)	2150,3
Viscosidade 100 ºC (mm^2/s)	20,27
Viscosidade 40 ºC (mm^2/s)	5,034
Índice de viscosidade	191
Fluidez (ºC)	15
Índice de acidez (mgKOH/g)	105,5
Bomba rotatória (min)	28
Rancimat (h)	3,08

Exemplo 5 – Determinação da acidez das reações

[00079] O teor de ácidos graxos livres nos óleos e produtos foi determinado por titulometria de neutralização. Os ácidos graxos livres, de cerca de 0,2g da amostra, foram titulados com solução 0,04 $mol.L^{-1}$ de NaOH em titulador automático Mettler modelo DG20 até o valor de pH 11,0 e a acidez da amostra foi determinada pela Equação 3.

[00080] Alternativamente, para amostras com um maior volume, os ácidos graxos livres, de cerca de 0,5 a 1g da amostra, foram titulados com solução 0,25 $mol.L^{-1}$ de NaOH empregando fenolftaleína como indicador e a acidez da amostra foi determinada pela Equação 3.

$$Acidez\,(\%\,m/m) = \frac{V \times M \times AG}{10 \times m}$$

(Equação 3)

Onde:

V = volume de soda utilizado na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de NaOH ($mol.L^{-1}$);

AG = massa molar do ácido graxo presente em maior concentração no óleo* (g);

m = massa de amostra (g).

*Óleo de soja = ácido linoleico (280g); Óleo de mamona = ácido ricinoleico (298g).

Exemplo 6 – Determinação do teor de ésteres metílicos

[00081] Para determinar o teor do éster metílico (biodiesel) nos produtos das reações de transesterificação, alíquotas de 20 µL foram diluídas em 480 µL de n-heptano e injetadas em cromatógrafo. Foi utilizado cromatógrafo a gás (SHIMADZU 2010) equipado com detector de ionização de chama (FID) e coluna capilar omegawax (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme). As condições das análises foram: temperatura inicial de 200°C por 5 minutos e, então, programada a uma taxa de 20°C/min até 260°C, permanecendo a 260°C por 6 min. As temperaturas do detector e do injetor foram de 250°C e 260ºC, respectivamente. Hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão de 2,0 mL/min e a injeção foi feita em modo split de 1:20. Heptadecanoato de metila foi utilizado como padrão interno e o teor de ésteres foi calculado por meio da Equação 4.

$$Teor\,de\,éster\,(\%\,m/m) = \frac{massa_{padrão} \times área_{éster} \times 100}{área_{padrão} \times massa_{amostra}}$$

(Equação 4)

Exemplo 7 - Conversão das reações de esterificação

[00082] A conversão de ácidos graxos livres em biolubrificantes foi acompanhada pelo método titulométrico (acidez) no qual foi observado o consumo dos AGLs. A conversão da reação foi calculada segundo a Equação 5 ou Equação 6.

[00083] Os resultados da Equação 5 estão expressos na forma de porcentagem de AGL esterificado desconsiderando o excesso de AGL nas reações, de forma que 100% de conversão equivale a 100% das hidroxilas do álcool esterificadas. Os resultados da Equação 6 estão expressos na forma de porcentagem de AGL esterificado, de forma que 100% de conversão equivale a 100% dos AGL esterificados.

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

(Equação 5)

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

(Equação 6)

Onde:

A_i = acidez inicial (%m/m);

A_f = acidez final (%m/m);

RM = razão molar inicial AGL/álcool;

H = número de hidroxilas na molécula do álcool

Exemplo 8 – Conversão da reação de transesterificação

[00084] A conversão da reação de transesterificação foi calculada segundo a Equação 7. Os resultados estão expressos na forma de porcentagem de biodiesel transesterificado, desconsiderando o excesso de biodiesel nas reações e os ácidos graxos livres formados, de forma que 100% de conversão equivale a 100% das hidroxilas do álcool esterificadas.

$$Conversão\ \ incluindo\ acidez\ (\%\, hidroxilas) = \frac{100 \times (E_i - (E_f + (A_f - A_i))) \times RM}{H \times E_i}$$

(Equação 7)

Onde:

Ei = teor de éster inicial (%m/m);

Ef = teor de éster final (%m/m);

Ai = acidez inicial (%m/m);

Af = acidez final (%m/m);

RM = razão molar inicial biodiesel/álcool;

H = número de hidroxilas na molécula do álcool

[00085] É evidente que os exemplos acima foram apresentados apenas em caráter ilustrativo, e que modificações e variações dos mesmos, óbvias para os técnicos no assunto, são consideradas como inclusas no escopo da presente invenção, tal como definida nas reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Processo para produção de ésteres, caracterizado por compreender reagir biodiesel metílico ou ácidos graxos livres com um álcool polihidroxilado, na presença de um biocatalisador, em que o biocatalisador é um sólido fermentado produzido pelo cultivo de um microrganismo em rejeito agroindustrial por fermentação em estado sólido.

2. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a reação do biodiesel metílico com o álcool polihidroxilado ser uma reação de transesterificação.

3. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por a reação dos ácidos graxos livres com o álcool polihidroxilado ser uma reação de hidroesterificação.

4. Processo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizado por o biodiesel ser biodiesel de soja ou de mamona.

5. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizado por o biocatalisador ser empregado em uma concentração de 10 a 30% em peso.

6. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizado por ser empregada uma razão molar de 2:1 a 5:1 de álcool para biodiesel metílico ou ácidos graxos livres.

7. Processo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os ácidos graxos livres serem obtidos pela reação de óleo de soja ou de mamona com um biocatalisador.

8. Processo de acordo com a reivindicação 7, caracterizado por o biocatalisador ser uma ou mais lipases comerciais ou uma ou mais lipases obtidas de sementes dormentes de mamona.

9. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado por o álcool polihidroxilado ser neopentilglicol, trimetilolpropano ou pentaeritritol.

10. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado por o microrganismo ser um fungo.

11. Processo de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de o fungo ser *Rhizomucor miehrei*.

12. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de o resíduo agroindustrial ser torta de algodão ou de babaçu.

13. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de o sólido fermentado ser adicionado na reação na forma de um liofilizado.

14. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de o sólido fermentado ser reutilizado pelo menos uma vez.

15. Processo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de incluir adicionalmente uma etapa de purificação dos ésteres produzidos.

16. Uso de ésteres produzidos pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15, caracterizado por ser como um biolubrificante.

17. Biolubrificante, caracterizado pelo fato de compreender os ésteres produzidos pelo processo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 15.

RESUMO

"PROCESSO PARA PRODUÇÃO DE ÉSTERES E BIOLUBRIFICANTES, CATALISADO POR SÓLIDO FERMENTADO"

A presente invenção se refere a um processo para produção de ésteres compreendendo a reação de biodiesel metílico ou ácidos graxos livres com um álcool polihidroxilado, na presença de um biocatalisador, o qual é um sólido fermentado contendo lipases de *Rhizomucor miehei* produzido pelo cultivo do microrganismo em rejeito agroindustrial por fermentação em estado sólido.