



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

AMANDA VIEIRA XAVIER

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES DO TIPO POLIOLÉSTERES POR
HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA POR LIPASES COMERCIAIS

RIO DE JANEIRO

2024

Amanda Vieira Xavier

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES DO TIPO POLIOLÉSTERES POR
HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA POR LIPASES COMERCIAIS

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Química - Atribuições
Tecnológicas, Universidade Federal do Rio
de Janeiro-UFRJ.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª Elisa d'Avila Costa Cavalcanti
Msc. Ana Cristina de Araujo Collaço

Rio de Janeiro
2024

Amanda Vieira Xavier

PRODUÇÃO DE BIOLUBRIFICANTES DO TIPO POLIOLÉSTERES POR
HIDROESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA CATALISADA POR LIPASES COMERCIAIS

Monografia apresentada ao Curso de
Graduação em Química - Atribuições
Tecnológicas, Universidade Federal do Rio
de Janeiro-UFRJ.

Aprovada em:

Profa. Elisa d'Avila Costa Cavalcanti, D.Sc., IQ-UFRJ

Prof. Rodrigo Volcan Almeida, D.Sc., IQ-UFRJ

Profa. Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras, D.Sc,
Campus Duque de Caxias Professor Geraldo Cidade-UFRJ

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, cujo apoio incondicional foi fundamental para que eu alcançasse este momento. À minha mãe que esteve comigo desde o início e cuja presença segue viva em mim, e ao meu pai, cujo esforço e amor me motivam a cada dia. Esta conquista também é um reflexo do que vocês representam para mim.

Aos membros da minha família – primas, tios, tias e especialmente aos meus avós, Marlene e Jeremias, que cuidam de mim desde pequena e sempre apoiaram meus sonhos. O apoio e o carinho de vocês têm sido essenciais na minha trajetória.

Aos meus amigos, antigos e novos, sou grata por todas as vezes que vocês me ajudaram a seguir em frente, especialmente nos momentos mais desafiadores. Vocês são uma parte importante desta conquista. Quando estava para baixo, vocês me empurravam para cima.

Aos meus amigos Felipe Carvalho, João Vicente e Kesia Oliveira que sempre me apoiaram e estiveram comigo nos melhores e piores momentos.

A todos os professores que tive durante minha trajetória e os que ainda irão contribuir com ela. Todos foram essenciais para minha formação não apenas teórica, mas como cidadã. Tenho imenso carinho, admiração e respeito por todos.

Ao LaBiM pelas valiosas oportunidades que me foram dadas, as quais foram cruciais para minha formação como pesquisadora e aos colegas de laboratório que sempre foram muito solícitos e puderam tornar os dias mais leves.

Às minhas orientadoras, Elisa e Ana, pela disponibilidade que sempre tiveram comigo e pela troca de conhecimentos constante. Pessoas essenciais para que eu pudesse chegar onde cheguei.

Ao meu companheiro, Guilherme. Conhecê-lo fez com que eu buscasse sempre ser melhor como pessoa e como parceira. A todos os momentos difíceis em que estive do meu lado, nos meus piores e melhores momentos.

Ao PRH 20.1 e à ANP pela bolsa concedida para realização deste projeto e por me tornar uma profissional mais capacitada.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	10
----------------------------	----

1.1 Lubrificantes.....	10
1.2 Biolubrificantes.....	12
1.3 Matérias-primas para os Biolubrificantes.....	14
1.4 Rotas de Produção dos Biolubrificantes.....	19
1.5 Lipases.....	20
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Materiais.....	22
3.2 Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para Produção de AGL.....	23
3.3 Hidrólise Enzimática do Óleo de Mamona para Produção de AGL.....	23
3.4 Reações de Esterificação Enzimática do AGL para produção do polioléster.....	24
3.5 Metodologia Analítica.....	24
3.5.1 Determinação da Acidez dos Óleos.....	24
3.5.2 Determinação das Conversões das Reações Enzimáticas de Esterificação.....	25
3.5.3 Cromatografia Gasosa.....	25
3.5.3.1 Derivatização das Amostras.....	25
3.5.3.2 Análise da Composição em Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa.....	26
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
4.1 Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para Produção de AGL.....	27
4.2 Hidrólise Enzimática do Óleo de Mamona para Produção de AGL.....	27
4.3 Influência do Tipo de Poliálcool e do Teor de Água sobre a Produção dos Biolubrificantes por Reação de Esterificação.....	28
4.4 Cinética da Reação de Esterificação para Produção de Biolubrificantes.....	30
4.4.1 Substrato: Mistura dos AGL do Óleo de Soja e Mamona.....	30
4.4.2 Substrato: AGL do Óleo de Mamona.....	38
4.4.3 Substrato: AGL do Óleo de soja.....	40
5. CONCLUSÃO.....	42
6. PERSPECTIVAS.....	43

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
--------------------------------------------	-----------

RESUMO

XAVIER, Amanda Vieira. **Produção de Biolubrificantes do Tipo Poliolésteres por**

Hidroesterificação Enzimática Catalisada por Lipases Comerciais. Rio de Janeiro, 2024. Monografia (Bacharelado em Química - Atribuições Tecnológicas) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Lubrificantes são substâncias obtidas majoritariamente através do processamento do petróleo, usadas para melhorar o movimento entre superfícies. No entanto, dezenas de milhares de toneladas de lubrificantes são descartadas de forma inadequada, causando danos ambientais significativos. Biolubrificantes são biodegradáveis e representam uma alternativa promissora para a sustentabilidade. Óleos vegetais são os materiais mais comumente usados na produção de biolubrificantes devido às suas propriedades favoráveis. O óleo de soja produz biolubrificantes com altos índices de viscosidade, frequentemente acima do valor de referência para um bom lubrificante. O óleo de mamona também oferece melhores pontos de fluidez e estabilidade oxidativa em comparação com o óleo de soja. O objetivo deste trabalho foi produzir biolubrificantes por esterificação a partir da mistura dos ácidos graxos livres (AGLs) do óleo de soja e de mamona, por catálise enzimática utilizando a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Novozym 40086). Foi realizada a síntese enzimática de biolubrificantes utilizando dois poliálcoois: neopentilglicol (NPG) e trimetilolpropano (TMP), diferentes concentrações de água (1%, 5% e 10%) e ácidos graxos livres (AGL) do óleo de soja e mamona como matéria-prima. A cromatografia gasosa (CG) foi realizada a fim de analisar, principalmente, a especificidade enzimática. Nos resultados obtidos com a mistura de AGL de soja e mamona 50%/50%, foram observados altas conversões (>90%) e um tempo reacional mais baixo (24h) para a reação utilizando NPG em relação à reação utilizando TMP, que obteve baixas conversões (<70%) e um tempo reacional mais alto (72h). Em relação à concentração de água, 1% proporcionou uma melhor solubilização dos poliálcoois e não influenciou a atividade enzimática. No entanto, concentrações mais elevadas de água (5% e 10%) mostraram-se desfavoráveis. Os cromatogramas não mostraram diferenças significativas para a incorporação dos AGL de soja e mamona pela Novozym 40086; porém a cinética das reações de esterificação dos AGLs separados evidenciaram que a enzima catalisa a esterificação dos AGL de soja com maior velocidade e eficiência.

Palavras-chave: *Rhizomucor miehei*; biocatálise; biolubrificantes; óleo de soja; óleo

de mamona; lipase.

ABSTRACT

XAVIER, Amanda Vieira. **Produção de Biolubrificantes do Tipo Poliolésteres por Hidroesterificação Enzimática Catalisada por Lipases Comerciais**. Rio de Janeiro, 2024. Monografia (Bacharelado em Química - Atribuições Tecnológicas) - Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2024.

Lubricants are substances primarily obtained through petroleum processing, used to improve movement between surfaces. However, tens of thousands of tons of lubricants are improperly disposed of, causing significant environmental damage. Biolubricants are biodegradable and represent a promising alternative for sustainability. Vegetable oils are the most commonly used materials in biolubricant production due to their favorable properties. Soybean oil produces biolubricants with high viscosity index, often above the reference value for a good lubricant. Castor oil also offers better pour points and oxidative stability compared to soybean oil. The aim of this work was to produce biolubricants by esterification from the mixture of free fatty acids (FFAs) from soybean and castor oil, through enzymatic catalysis using immobilized commercial lipase from *Rhizomucor miehei* (Novozym 40086). Enzymatic synthesis of biolubricants was carried out using two polyalcohols: neopentyl glycol (NPG) and trimethylolpropane (TMP), different water concentrations (1%, 5%, and 10%), and free fatty acids (FFAs) from soybean and castor oil as raw materials. Gas chromatography (GC) was performed to analyze mainly enzymatic specificity. In the results obtained with the soybean and castor oil FFA mixture at 50%/50%, high conversions (>90%) and a lower reaction time (24h) were observed for the reaction using NPG compared to the reaction using TMP, which achieved low conversions (<70%) and a longer reaction time (72h). Regarding water concentration, 1% provided better solubilization of polyalcohols and did not influence enzymatic activity. However, higher water concentrations (5% and 10%) proved unfavorable. The chromatograms showed no significant differences in the incorporation of soybean and castor oil FFAs by Novozym 40086; however, the kinetics of esterification reactions of separated FFAs evidenced that the enzyme catalyzes the esterification of soybean FFAs with higher speed and efficiency.

Keywords: *Rhizomucor miehei*; biocatalysis; biolubricants; soybean oil; castor oil;

lipase.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lubrificantes

Lubrificantes são substâncias utilizadas para facilitar o movimento relativo de corpos sólidos, minimizando o atrito e o desgaste entre as superfícies de contato. Eles desempenham um papel fundamental na indústria e no transporte. A redução do atrito e do desgaste permite que as máquinas funcionem sem falhas prematuras, aumentando sua vida útil, resultando em economia de energia e controle das emissões (BART; GUCCIARDI; CAVALLORO, 2013).

Os primeiros lubrificantes utilizados pelos humanos consistiam em óleos de origem animal e vegetal. No decorrer do século XIX, esses óleos naturais à base de triglicerídeos foram gradualmente substituídos por lubrificantes derivados do petróleo, conhecidos como óleos minerais. Atualmente, os óleos minerais estão sendo substituídos por óleos sintéticos, produzidos por meio de reações químicas. Essa transição ocorre devido aos padrões de qualidade cada vez mais exigentes, nem sempre alcançados pelos óleos minerais convencionais, e às normas ambientais mais rigorosas impostas pela legislação, como índice de viscosidade (IV) extremamente alto, ponto de fluidez muito baixo, biodegradabilidade etc (SILVA, 2017).

Os lubrificantes podem ser classificados de acordo com critérios físicos, estado de agregação, ou químicos, classe química ou origem. Dessa forma, os lubrificantes podem ser agrupados como líquidos (óleos), semissólidos (graxas), sólidos (lubrificantes secos) e gases (ar comprimido ou outros gases) (BART; GUCCIARDI; CAVALLORO, 2013). Os óleos básicos representam os componentes predominantes na composição dos óleos lubrificantes, representando em geral mais de 90% do seu volume, geralmente derivados do processamento do petróleo. Esses óleos podem ser classificados principalmente como minerais ou sintéticos, dependendo da origem ou do método de produção (SILVA, 2019).

Segundo o American Petroleum Institute (API), os óleos básicos podem ser classificados em cinco grupos, conforme ilustrado na Tabela 1. A produção de cada um dos óleos desses grupos pode ser observada no esquema da Figura 1.

Tabela 1. Classificação dos óleos básicos segundo a API.

Categoria	Saturados (%) ¹	Enxofre (%P) ²		Índice Viscosidade ³	
Grupo I	< 90	e/ou	> 0,03	e	80 - 120
Grupo II	≥ 90	e	≤ 0,03	e	80 - 120
Grupo III	≥ 90	e	≤ 0,03	e	> 120
Grupo IV	Polialfaolefinas (PAO)				
Grupo V	outros óleos básicos não incluídos nos grupos I, II, III ou IV				

API 1509, 2023; SILVA; FREIRE, 2017.

¹ Norma ASTM D2007 para saturados < 75,0% ou norma ASTM D7419 para saturados ≥ 75,0% convertendo para norma ASTM D2007.

² Norma ASTM D1552, ASTM D2622, ASTM D3120, ASTM D4294 ou ASTM D4927.

³ Norma ASTM D2270.

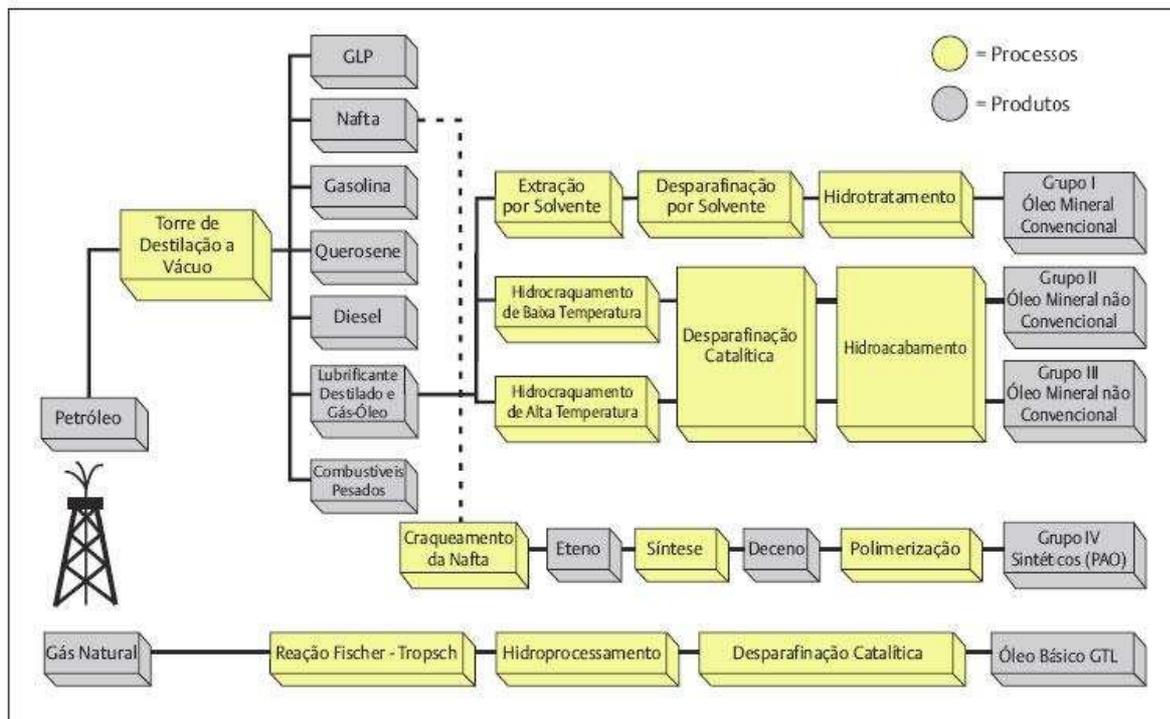


Figura 1. Produção dos óleos básicos que constituem mais de 90% da composição dos óleos lubrificantes.

O desempenho dos lubrificantes é avaliado por sua habilidade de controlar o

atrito, o desgaste, a temperatura, a corrosão, remover contaminantes e capacidade de vedação. Elaborar a formulação de um óleo lubrificante é uma tarefa complexa, que demanda um estudo aprofundado sobre a compatibilidade entre diferentes tipos de óleos minerais puros, também conhecidos como óleos básicos, e uma variedade de aditivos.

Para alcançar as características desejadas em um óleo lubrificante, são conduzidas análises físico-químicas que possibilitam uma avaliação preliminar de seu desempenho. Algumas dessas análises não replicam exatamente as condições encontradas na prática; no entanto, são métodos empíricos que oferecem resultados comparativos significativos quando combinados com os métodos científicos desenvolvidos em laboratórios. Dentre as análises físico-químicas exigidas pela ANP, resolução nº 804 de 2019, para os óleos lubrificantes, estão: viscosidade cinemática e dinâmica, índice de viscosidade, ponto de fluidez, ponto de fulgor, estabilidade oxidativa, corrosividade ao cobre, biodegradabilidade, dentre outras (PAULI; ULIANA, 1997).

1.2 Biolubrificantes

Os óleos lubrificantes são substâncias obtidas majoritariamente através do processamento do petróleo, matéria-prima não renovável. No mundo, doze milhões de toneladas por ano de lubrificantes são dispensados no meio ambiente de forma incorreta gerando um grande dano ambiental. É fundamental, portanto, que haja um compromisso com a busca por soluções mais sustentáveis na indústria, de forma a minimizar os impactos ambientais e promover um futuro mais viável para o planeta. Nesse contexto, a utilização de biolubrificantes, em substituição aos lubrificantes tradicionais, pode ser um passo importante nesse caminho (BART; GUCCIARDI; CAVALLORO, 2013).

O termo biolubrificantes inclui óleo lubrificantes, graxas lubrificantes, óleos de motor de 2 tempos, fluidos hidráulicos e óleos de corrente que não são tóxicos para os seres humanos e para a vida aquática e, podem se biodegradar em um tempo relativamente curto. As principais vantagens para o uso dos biolubrificantes são alta biodegradabilidade, baixa toxicidade para humanos e organismos aquáticos, boas

propriedades de lubrificação, alto índice de viscosidade, alto ponto de fulgor e boa adesão a superfícies metálicas. Contudo alguns problemas são observados relacionados à estrutura química dos lubrificantes ésteres preparados com ácidos graxos insaturados, como a baixa estabilidade oxidativa e térmica, comportamento hidrolítico, tendência a cristalizar em baixas temperaturas e a incompatibilidade com filtros e componentes do sistema (principalmente elastômeros, presentes nas juntas de vedação) (BONDIOLI; DELLA BELLA; MANGLAVITI, 2003).

Em termos gerais, biodegradabilidade significa a tendência de um lubrificante ser metabolizado por micro-organismos em até um ano, resultando em produtos não tóxicos, como CO₂ e água. Comparando-se a biodegradabilidade dos óleos minerais, comumente usados como lubrificantes, e dos óleos vegetais, os óleos minerais apresentam 20% de biodegradabilidade enquanto os óleos vegetais apresentam tipicamente 99% de biodegradabilidade, reduzindo para 90 a 98% após a mistura com aditivos (SILVA; FREIRE, 2017) De acordo com a ANP, resolução nº 804 de 2019, a degradabilidade deve ser maior ou igual a 60% (m/m) após 28 dias para lubrificantes biodegradáveis (avaliação pelos métodos ASTM D5864, OECD 301 ou ISO 9439).

Os ésteres predominantemente empregados como biolubrificantes incluem ftalatos, diésteres, C₃₆ dimeratos, trimetilatos e ésteres resultantes da reação entre ácidos monocarboxílicos ou dicarboxílicos e poliálcoois (álcoois com múltiplos grupos hidroxila), também referidos como poliolésteres (GRECO-DUARTE, 2018) (Figura 2).

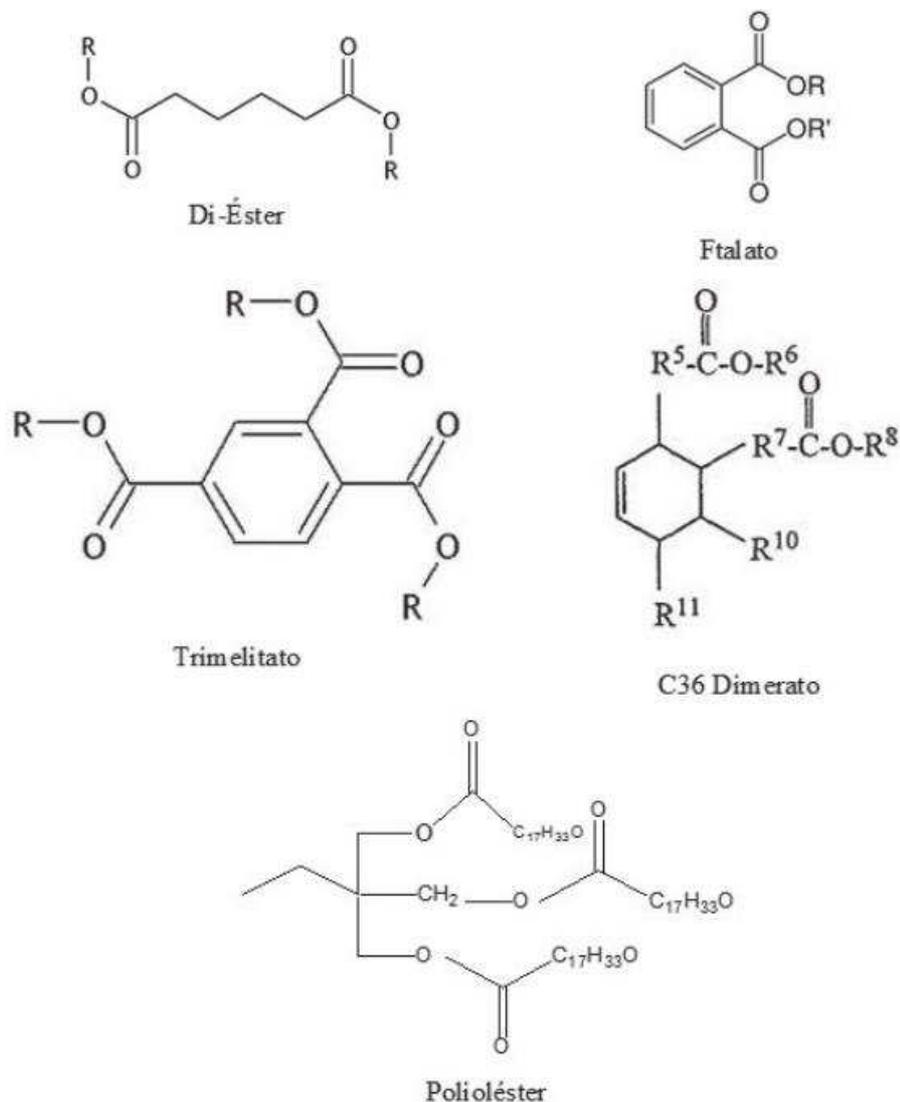


Figura 2. Estrutura química dos ésteres mais utilizados como biolubrificantes (SILVA; FREIRE, 2017).

1.3 Matérias-primas para os Biolubrificantes

Os óleos vegetais consistem na matéria-prima mais utilizada para a produção dos biolubrificantes devido às características favoráveis dos seus produtos finais, como índice de viscosidade apropriado e bom ponto de fluidez, mas sua aplicação é limitada por suas propriedades térmicas e estabilidade oxidativa. A estabilidade do biolubrificante pode ser melhorada quando o glicerol é substituído por polióis com um átomo de carbono quaternário, como o neopentilglicol (NPG) e o trimetilolpropano (TMP), gerando, desta forma, um biolubrificante de éster de poliálcool ou poliéster (POE)

Figura 4. Reações de decomposição térmica na presença e na ausência de hidrogênios β em ésteres.

Já a estabilidade oxidativa desses poliésteres está intimamente ligada à composição em ácidos graxos da matéria-prima vegetal ou animal. A presença de insaturações na porção do éster proveniente dos ácidos graxos funciona como sítios ativos para várias reações de oxidação fazendo com que esses ésteres tenham uma estabilidade oxidativa baixa. Dessa forma, ácidos graxos saturados têm uma estabilidade oxidativa mais alta (SILVA; FREIRE, 2017). Essa degradação oxidativa, facilitada pela presença de insaturações, gera falhas nos equipamentos, devido à formação de lodo, gerando obstrução de filtros e tubulações, e formação de ácidos, responsáveis pela corrosão (BONDIOLI; DELLA BELLA; MANGLAVITI, 2003).

Devido à presença de insaturações, há também a presença de hidrogênios alílicos e bis-alílicos, ou seja, hidrogênios localizados em uma posição vizinha a uma ligação dupla ou vizinha a duas ligações duplas, respectivamente. Na Figura 5 são apresentados os ácidos graxos presentes em proporção majoritária nos óleos de soja (ácido oleico e linoleico) e mamona (ácido ricinoleico) e foram circulados os grupos metilenos onde estão localizados os hidrogênios alílicos ou bis-alílicos.

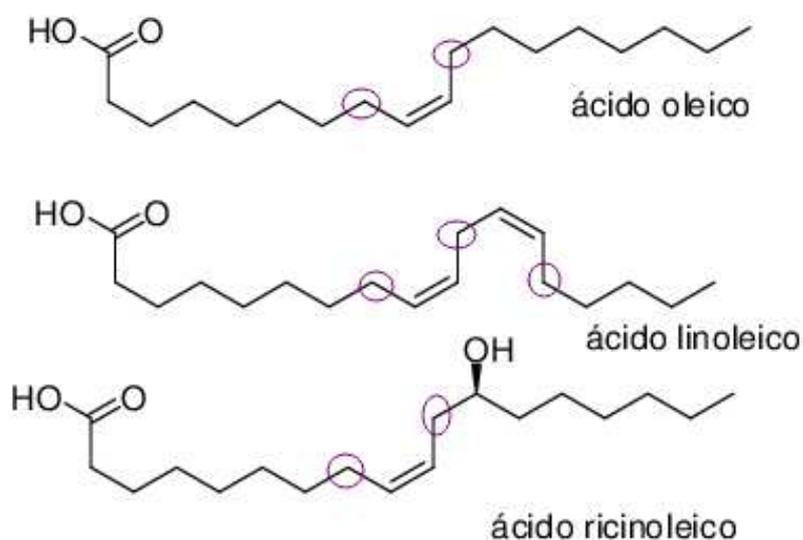


Figura 5. Estruturas moleculares dos ácidos graxos presentes em maior proporção nos óleos de soja (ácido oleico e linoleico) e mamona (ácido ricinoleico). Os grupos metilenos onde estão localizados os hidrogênios alílicos ou bis-alílicos estão

circulados.

Esses hidrogênios possuem baixa entalpia de ligação podendo ser mais facilmente abstraídos por um iniciador qualquer presente no meio, iniciando, portanto, a reação de oxidação. Na figura 6 é possível observar o esquema mecanístico da degradação oxidativa de um ácido linoleico.

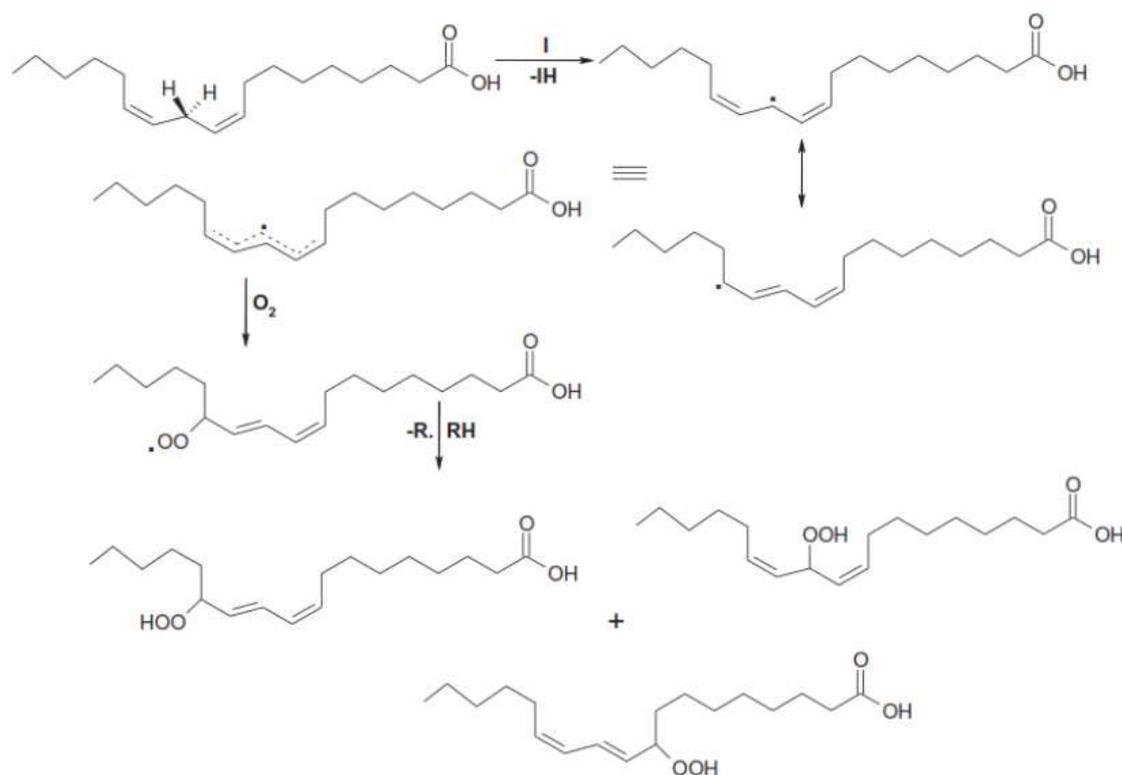


Figura 6. Esquema mecanístico da degradação oxidativa de um ácido linoleico.

Por outro lado, o desempenho dos ésteres produzidos com materiais de partida ricos em ácidos graxos saturados, em baixas temperaturas, será pior em comparação aos produzidos com matérias-primas que possuem majoritariamente ácidos graxos mono ou poli-insaturados, ou seja, os biolubrificantes produzidos com ácidos graxos saturados terão maior ponto de fluidez e conseqüentemente irão diminuir a lubrificação em locais mais frios acarretando danos ao equipamento (SILVA; FREIRE, 2017).

De acordo com a literatura, biolubrificantes produzidos a partir de óleo de soja apresentam bons índices de viscosidade, acima de 198, muitas vezes acima do valor de referência (150) para um bom lubrificante (AGUIEIRAS et al., 2020). O índice de viscosidade está relacionado à medida da variação da viscosidade em função da variação da temperatura; a viscosidade está relacionada a resistência do fluido ao

escoamento.

Já os biolubrificantes produzidos a partir do óleo de mamona possuem melhores pontos de fluidez, menores do que $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, e estabilidade oxidativa, maior do que 30 minutos, se comparados aos produzidos a partir do óleo de soja (AGUIEIRAS et al., 2020). O ponto de fluidez é a temperatura mais baixa registrada na qual um óleo ainda é fluido, o ácido ricinoleico (presente em proporção majoritária no óleo de mamona) possui uma hidroxila no carbono 12, diferente dos ácidos linoleico e oleico (presentes em maior proporção no óleo de soja) que não possuem hidroxilas. A hidroxila presente no ácido ricinoleico deixa-o capaz de interagir com outras moléculas por ligação de hidrogênio, interação intermolecular fraca. Essa interação forma dímeros, trímeros ou até moléculas maiores que geram um impedimento estérico, reduzindo o empilhamento entre as moléculas (interações dipolo-dipolo) e reduzindo, portanto, o ponto de fluidez. Já em relação à estabilidade oxidativa, o ácido ricinoleico, por possuir menos insaturações do que o ácido linoleico, reduz o número de sítios ativos para possíveis reações de oxidação, aumentando, dessa forma, a estabilidade oxidativa.

Não se sabe se a mistura desses dois óleos utilizados como matéria-prima poderia gerar um óleo base com propriedades lubrificantes melhoradas, mas é uma área interessante para ser explorada.

Outro aspecto relevante a ser considerado é a utilização de matérias-primas típicas de cada país e, no cenário do brasileiro, esses dois óleos são interessantes para serem empregados como matéria-prima. No Brasil, pequenos produtores são incentivados a plantar mamona, facilmente cultivável nas condições climáticas brasileiras. Dessa forma, esses produtores podem vender as sementes de mamona para os produtores de óleo e de biodiesel, os quais também podem produzir biolubrificantes. Promovendo, portanto, inclusão social, principalmente em países em desenvolvimento. Além disso, o uso dessa oleaginosa no setor industrial não compete com o uso alimentar, pois esta não é comestível (SILVA; FREIRE, 2017). Em relação ao óleo de soja, no Brasil a produção de soja segue em crescimento, a safra de 2022/23 alcançou um novo recorde, estimada em 154,6 milhões de toneladas, crescimento de 23,2% (Conab, 2023). Esses valores evidenciam a importância dessa oleaginosa para a economia do país.

1.4 Rotas de Produção dos Biolubrificantes

Atualmente, a produção industrial de poliolésteres lubrificantes geralmente emprega rotas químicas, embora pesquisas estejam sendo conduzidas para explorar rotas enzimáticas devido aos potenciais benefícios em termos de eficiência e sustentabilidade. Os poliolésteres são produzidos na reação entre álcoois poli-hídricos e ácidos mono ou dicarboxílicos. Eles também são denominados ésteres impedidos e são utilizados em turbinas de aviões e na formulação de óleos para motores automotivos (SILVA; FREIRE, 2017).

Embora a produção de poliolésteres lubrificantes por meio da rota química seja amplamente adotada na indústria, esta rota apresenta várias desvantagens significativas. Primeiramente, o processo químico convencional pode ter um alto impacto ambiental devido ao uso de solventes e reagentes tóxicos, aumentando o risco de contaminação ambiental.

Além disso, a dependência de recursos não renováveis e a complexidade dos processos químicos podem resultar em altos custos de produção e limitações na diversidade de produtos, dificultando a produção de lubrificantes personalizados para atender às demandas específicas do mercado. Essas preocupações destacam a necessidade de explorar alternativas mais sustentáveis e eficientes, como as rotas enzimáticas, para enfrentar os desafios ambientais e econômicos associados à produção de lubrificantes.

1.5 Lipases

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem crescendo e dentre os processos de maior interesse estão as reações catalisadas por lipases (triacilglicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3 – IUPAC). Essas enzimas são biocatalisadores que têm muitas aplicações e elevado potencial biotecnológico por possuírem alta estabilidade em solventes orgânicos; não requererem a presença de cofatores; possuírem uma larga especificidade pelo substrato e exibirem uma alta enantiosseletividade. Essas vantagens vêm gerando o desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização destas enzimas no setor industrial (BART; GUCCIARDI; CAVALLORO, 2013).

Estudos cinéticos relacionados às lipases descreveram um fenômeno

conhecido por ativação interfacial. Esse fenômeno está relacionado ao aumento de atividade das lipases quando em uma interface água-substrato insolúvel, que formam emulsões. A explicação para esse fenômeno está diretamente ligada à estrutura tridimensional da lipase. O sítio catalítico das lipases é coberto por uma estrutura denominada de tampa que ao interagir com o substrato insolúvel, interações hidrofóbicas e eletrostáticas, se abre, estabilizando a conformação aberta da enzima, deixando seu sítio ativo mais acessível ao substrato e, dessa forma, aumentando a atividade enzimática (CASTRO et al., 2004).

A produção de POE usando enzimas ao invés de catalisadores químicos tem diversas vantagens, como a alta especificidade e seletividade das enzimas (diminuindo o número de produtos secundários) e o uso de condições mais brandas de temperatura e pressão (evitando a formação de produtos de degradação térmica e reações descontroladas) (CASTRO et al., 2004).

A lipase comercial de *Candida rugosa* (recentemente renomeada como *Diutina rugosa*) tem sido relatada como um excelente catalisador para a utilização em derivados de mamona, seja para produção de estolídeos (oligômeros de ácidos graxos, nesse caso o ácido ricinoleico) (GRECO-DUARTE et al., 2019; GRECO-DUARTE et al., 2017; BÓDALO-SANTOYO et al., 2005) como na produção de biolubrificantes a partir do biodiesel metílico de mamona e trimetilolpropano, reação na qual foram constatadas conversões altas, em torno de 98%, se comparadas com a mesma reação via catálise química na qual foram verificadas conversões em torno de 70% (DA SILVA et al., 2015).

A lipase de *Rhizomucor miehei* é uma lipase típica que catalisa as reações de esterificação ou hidrólise de lipídios, além de outras reações como acidólise, alcoólise, glicerólise e interesterificação. Na literatura são relatadas reações de esterificação utilizando lipases de *Rhizomucor miehei*, como as reações para produção de biolubrificantes a partir de óleo de soja e mamona utilizando a lipase imobilizada de *Rhizomucor miehei* (RM IM) que apresentaram altos rendimentos de conversão de até 90% (AGUIEIRAS et al., 2020).

Os tópicos explorados nessa introdução abrangeram o panorama dos lubrificantes, desde os primórdios dos óleos naturais até os biolubrificantes contemporâneos. Foi observada a variedade de categorias de lubrificantes, desde os líquidos até os gases, e examinou os óleos básicos que fundamentam suas

composições. A investigação permitiu uma compreensão não apenas da relevância prática desses fluidos, mas também dos desafios ambientais inerentes ao seu uso difundido. A introdução dos biolubrificantes como uma alternativa mais verde evidenciou uma mudança crucial em direção a práticas mais responsáveis na indústria de lubrificantes. À medida que são exploradas as possibilidades das rotas de produção, desde as tradicionais (químicas) até as enzimáticas, vislumbra-se um futuro em que a eficiência se alia à responsabilidade ambiental.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve como objetivo produzir biolubrificantes por esterificação a partir da mistura dos ácidos graxos livres do óleo de soja e de mamona, por catálise enzimática utilizando a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as melhores condições reacionais (proporção de água e tipo de poliálcool) para a reação de esterificação da mistura dos AGL de soja e de mamona, catalisada pela lipase comercial de *R. miehei*;
- Estudar a especificidade por substrato da enzima em relação ao tipo de poliálcool;
- Estudar a especificidade por substrato da enzima em relação ao tipo de AGL.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM), do Instituto de Química da UFRJ.

3.1 Materiais

Os biocatalisadores utilizados foram a lipase comercial liofilizada de *Diutina rugosa* (LipomodTM 34MDP) obtida da Biocatalysts Ltd (Cardiff, UK) e a lipase comercial imobilizada de *Rhizomucor miehei* (Novozym 40086) obtida da Novozymes Latin America Ltda. O óleo de mamona foi adquirido da empresa Campestre (São Bernardo do Campo, Brasil); As sementes de mamona foram doadas pela Bioóleo Bahia (Feira de Santana, Brasil). O óleo de soja foi adquirido no mercado local. Trimetilolpropano (TMP) e neopentilglicol (NPG) foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para Produção de AGL

A hidrólise do óleo de soja foi conduzida em um reator de 2L com agitação mecânica a 200 rpm, conforme metodologia de CAVALCANTI et al, 2018. Óleo de soja (50% v/v), tampão fosfato de sódio 100 mM pH 7,0 (50% v/v) e a lipase 34MDP (1% m/v de óleo) foram incubados a 40 °C por 4h. Em seguida, o óleo hidrolisado, composto majoritariamente por ácidos graxos livres (AGL), foi recuperado por extração com hexano. O hexano foi removido utilizando-se rotaevaporador e o teor de AGL foi determinado pela acidez, como descrito no item 3.5.1.

3.3 Hidrólise Enzimática do Óleo de Mamona para Produção de AGL

Conforme metodologia de Greco Duarte, 2018, inicialmente, uma mistura de tampão acetato de sódio (0,1 M pH 4,0) (50% v/v) e sementes de mamona, razão de sementes:tampão de 1:5 (m/v), foi triturada em liquidificador e transferida para um reator encamisado de 2L com agitação mecânica à 200 rpm. Em seguida, o óleo de mamona (50% v/v) foi adicionado, mantendo a razão de sementes:tampão:óleo de 1:5:5 (m/v/v), e a mistura foi incubada a 30 °C por 14h.

Após as 14h, interrompeu-se a reação mediante a adição do solvente acetato de etila na proporção de 2:1 solvente/meio reacional (v/v), resultando na formação de duas fases. A fase superior foi recuperada e armazenada, enquanto a fase inferior foi submetida a centrifugação por 5 minutos a 10.000 rpm, com o propósito de separar a emulsão e extrair os AGLM (ácidos graxos livres de mamona) dissolvidos no solvente. Ao solvente recuperado foi adicionado 10% (m/v) de sulfato de sódio anidro. Essa mistura foi mantida sob agitação magnética, em capela, por 30 minutos, visando

absorver a umidade presente no solvente. Após o período estipulado, a agitação foi cessada, permitindo a decantação do sulfato de sódio anidro. Em seguida, o solvente enriquecido com AGLM foi filtrado utilizando papel de filtro. O solvente foi posteriormente recuperado por meio de um rotaevaporador (PolyScience®) para ser reutilizado, enquanto os AGLM foram armazenados para as reações de esterificação.

3.4 Reações de Esterificação Enzimática do AGL para produção do poliéster

As reações de esterificação para produção dos poliésteres derivados de TMP e NPG foram realizadas em reatores abertos, agitados magneticamente e termostatizados, de 20 mL de volume útil. As reações foram conduzidas utilizando a lipase Novozym 40086 e o meio reacional foi composto pelos substratos (AGL e álcoois) na razão molar AGL/NPG 2,5:1 e AGL/TMP 3,75:1, água em diferentes proporções (1%, 5% e 10% em relação ao volume reacional total), enzima (4% m/m) e foi incubada a 40 °C por até 96 horas. A fim de garantir a solubilização dos álcoois no meio reacional, estes foram homogeneizados por cerca de 2 a 3 horas. Após esse procedimento, as reações foram iniciadas a partir da adição da enzima. O progresso da reação foi monitorado tirando alíquotas em intervalos fixos. As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm/5 min) e analisadas por titulação conforme descrito na seção 3.5.1.

3.5 Metodologia Analítica

3.5.1 Determinação da Acidez dos Óleos

100 µL de amostra foi dissolvida em 40 mL de solução de acetona/etanol 1:1 e, titulada com solução de NaOH 0,04 mol.L⁻¹ usando um titulador automático Mettler modelo DG20 até pH 11. A determinação do teor de acidez, que corresponde ao teor de AGL (% m/m), foi determinado através da seguinte equação:

$$\text{Acidez (\%m/m)} = \frac{V \times M \times MM}{10 \times m}$$

(Eq. 1)

Onde:

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

M = concentração da solução de NaOH (mol.L⁻¹);

MM = massa molar do ácido graxo presente em maior concentração no óleo (ácido linoleico para o óleo de soja e ácido ricinoleico para o óleo de mamona) (g);

m = massa de amostra (g).

3.5.2 Determinação das Conversões das Reações Enzimáticas de Esterificação

As conversões de AGL em poliésteres e dos grupos hidroxila dos polióis em grupos ésteres foram determinadas através das seguintes equações, respectivamente ((CAVALCANTI et al., 2018):

$$\text{Conversão AGL (\%)} = \frac{100 \times (A_0 - A_t)}{A_0} \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde:

A₀ = acidez no tempo 0;

A_t = acidez no tempo t.

$$\text{Conversão OH (\%)} = \frac{100 \times (A_0 - A_t) \times RM}{H \times A_0} \quad (\text{Eq. 3})$$

Onde:

A₀ = acidez no tempo 0;

A_t = acidez no tempo t;

RM = razão molar AGL/poliol;

H = número de grupos hidroxila na molécula do poliol.

3.5.3 Cromatografia Gasosa

3.5.3.1 Derivatização das Amostras

Quinze microlitros das amostras foram transferidos para tubos de hidrólise Schott previamente pesados, no qual foram adicionadas 5 gotas de etanol e posterior agitação suave em vórtex. Os tubos foram introduzidos em atmosfera de N₂ para eliminação do álcool e da água. Em seguida, os tubos foram pesados novamente e adicionado 2,4 mL de isopropanol com padrão (ácido heptadecanóico) 0,6 mg/mL em cada com agitação em vórtex e adição posterior de 0,6 mL de hexano. Posteriormente, foi adicionado 300 µL de cloreto de acetila (catalisador), com agitação suave em vórtex na capela, seguindo-se o aquecimento em banho de água com agitação a 80 °C por 20 minutos; em seguida, os tubos foram resfriados à temperatura ambiente. Adicionou-se lentamente 3,0 mL de KHCO₃ (15 % m/v) para paralisar a reação e neutralizar o catalisador, seguindo-se a agitação em vórtex por 30 segundos e centrifugação a 2.000 rpm por 10 min. Após centrifugação, a fase superior (orgânica) foi então transferida cuidadosamente para frascos de armazenagem (vials) de 2,0 mL e as amostras foram analisadas em cromatógrafo a gás (CG). As análises foram feitas em duplicata e o ensaio em branco foi realizado com água deionizada (GRECO-DUARTE, 2018).

3.5.3.2 Análise da Composição em Ácidos Graxos por Cromatografia Gasosa

Os ácidos graxos que foram submetidos à isopropilação conforme descrito na seção 3.5.3.1, com o intuito de serem convertidos em compostos mais voláteis, foram posteriormente analisados utilizando um cromatógrafo a gás (GC-2010; Shimadzu, Japan) equipado com uma coluna fast, capilar, composta de polietilenoglicol (Omegawax 100; 15 m×0,1 mm×0,1 µm; Sigma, São Paulo, Brasil).

As condições empregadas foram as seguintes: temperatura de 260 °C; utilização de hélio como gás de arraste a uma vazão de 3,0 mL/min; volume de injeção da amostra de 1,0 µL com uma razão de split de 1:200. A temperatura inicial da coluna foi estabelecida em 140 °C, aumentando a uma taxa de 60 °C/min até atingir 210 °C, onde permaneceu por 2 minutos; em seguida, foi aumentada a uma taxa de 20 °C/min até alcançar 260 °C, mantendo-se nessa temperatura por 1 minuto. Finalmente, a

temperatura foi aumentada a uma taxa de 10 °C/min até 280 °C, onde permaneceu constante por 12 minutos, totalizando um tempo de corrida de 20,67 minutos. A temperatura do detector de ionização em chama foi mantida em 280 °C (GRECO-DUARTE, 2018).

O percentual de ácido graxo livre foi calculado segundo a Equação 4.

$$AR = 100 \times \frac{mPI \times A_{AGL}}{ma \times API} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

AR = ácido graxo livre remanescente (g/100 g amostra, % m/m);

mPI = Massa do padrão interno (g);

A_{AGL} = Área do pico do ácido graxo livre remanescente;

ma = massa de amostra(g);

API = Área do pico do padrão interno.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Hidrólise Enzimática do Óleo de Soja para Produção de AGL

A hidrólise do óleo de soja para produzir AGLs foi realizada de forma eficiente usando a lipase Lipomod 34MDP como biocatalisador, conforme descrito na seção 3.2. A eficiência da reação foi avaliada pela diferença de acidez do óleo antes e após reação de hidrólise que foi de 0,18% para 95,02% de acidez; semelhante à acidez obtida por Cavalcanti et al. (2018) para o hidrolisado de óleo de soja, de 94 ± 1% (m/m).

4.2 Hidrólise Enzimática do Óleo de Mamona para Produção de AGL

A hidrólise do óleo de mamona para produzir AGLs foi realizada de forma eficiente utilizando as lipases presentes nas próprias sementes de mamona. A eficiência da reação foi avaliada pela diferença de acidez do óleo antes e após reação de hidrólise que foi de 1,90% para 88,16% de acidez; semelhante à acidez obtida por

Greco-Duarte et al. (2017) para o hidrolisado de óleo de mamona, de $91,9 \pm 0,65\%$.

4.3 Influência do Tipo de Poliálcool e do Teor de Água sobre a Produção dos Biolubrificantes por Reação de Esterificação

Inicialmente, foram conduzidas reações empregando uma mistura composta por 50% de AGL de óleo de soja e 50% de AGL de óleo de mamona como substrato. Dois tipos diferentes de poliálcoois foram avaliados separadamente, o neopentilglicol (NPG) com duas hidroxilas e, o trimetilolpropano (TMP) com três hidroxilas. A enzima Novozym 40086 foi empregada como biocatalisador e a reação foi conduzida sem adição de água ao meio reacional. Os resultados dessas reações de esterificação estão apresentados na Figura 7.

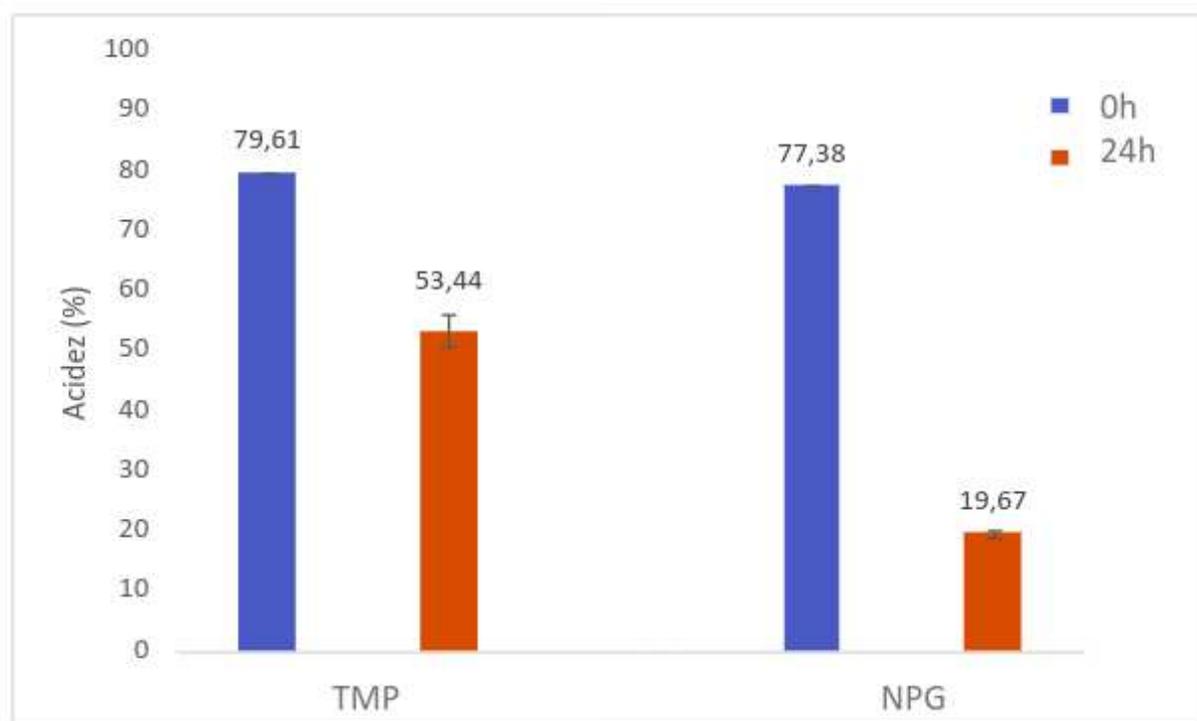


Figura 7. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando uma mistura de 50% de AGL de soja e 50% de AGL de mamona e diferentes polióis (NPG e TMP).

A conversão dos AGL em ésteres de TMP foi de $32,9 \pm 3,4\%$, enquanto para a reação com NPG foi de $74,6 \pm 0,8\%$ em 24 h de reação, mostrando que a enzima atua preferencialmente no poliálcool com menor número de hidroxilas.

Notou-se uma solubilização lenta dos polióis no meio reacional, uma vez que estes são sólidos e apresentam baixa solubilidade nos AGL hidrofóbicos. Assim, diferentes concentrações de água (1%, 5% e 10% v/v de meio reacional) foram avaliadas para solubilizar os poliálcoois, bem como garantir a microcamada de água necessária para a atividade da enzima (LÓPEZ-FERNÁNDEZ; BENAIGES; VALERO, 2020). Os resultados das reações com adição de água ao meio reacional estão apresentados na Figura 8.

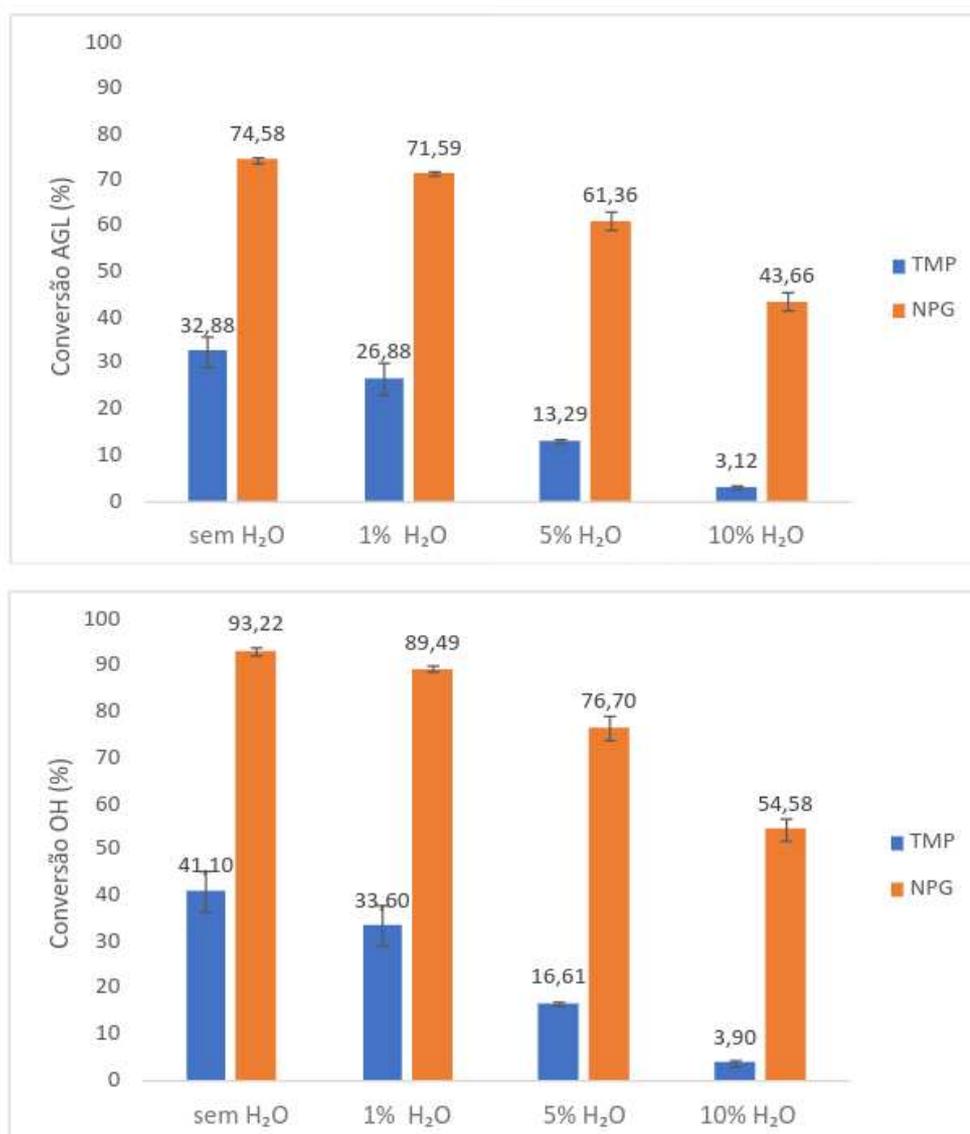


Figura 8. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086

utilizando uma mistura de 50% de AGL de soja e 50% de AGL de mamona, diferentes polióis (NPG ou TMP) e diferentes concentrações de água (1%, 5% ou 10% v/v do meio reacional), no tempo de 24h de reação. Os resultados são expressos como a porcentagem de AGL esterificados (gráfico superior) e da porcentagem de grupos hidroxila convertidos em poliolésteres (gráfico inferior).

A adição de água na concentração de 1% não influenciou de forma significativa a conversão em ésteres de poliálcool, enquanto para as concentrações de água de 5 e 10%, o efeito foi consideravelmente desfavorável, conforme evidenciado na Figura 8. Comparando-se a reação sem adição de água e a reação com 5% de água, para a reação com NPG, a conversão em AGL foi de $74,6 \pm 0,8\%$ para $61,4 \pm 2,1$ enquanto para a reação com TMP foi de $32,9 \pm 3,4\%$ para $13,3 \pm 0,4\%$. Este efeito negativo é provavelmente devido ao fato de que a água é um dos produtos da reação de esterificação. Seguindo o Princípio de Le Chatelier, o aumento na concentração de um dos produtos de uma reação favorece a reação inversa, resultando em uma redução na concentração do éster desejado, como indicado pela diminuição na conversão de AGL em ésteres de poliálcool.

Considerando a conversão dos grupos hidroxila do poliálcool em grupos éster (conversão em OH, na Figura 8), a reação sem adição de água alcançou uma conversão de $93,2 \pm 1,0\%$, representando um excelente resultado, mas reduziu para $76,7 \pm 2,7\%$ com a adição de 5% de água.

A adição de 1% de água nas reações foi selecionada como sendo a condição mais interessante para as reações subsequentes, uma vez que a solubilização dos dois poliálcoois ocorreu de forma mais rápida, com um ganho em tempo estimado, antes de iniciar a reação, de cerca de 30 minutos a 1 hora.

4.4 Cinética da Reação de Esterificação para Produção de Biolubrificantes

4.4.1 Substrato: Mistura dos AGL do Óleo de Soja e Mamona

Com o objetivo de avaliar o potencial da lipase Novozym 40086 como biocatalisador nesse processo e conhecer a cinética da reação, esta foi conduzida até 96 horas, com coletas de amostras a cada 24 horas. Os resultados com o NPG podem ser observados na Figura 10 e com o TMP na Figura 9.

A reação com o NPG apresentou uma redução significativa na acidez, conforme

evidenciado na Figura 10, com melhor resultado de $94,3 \pm 0,3\%$ de conversão das hidroxilas no tempo de 24h de reação, indicando o sucesso da reação de esterificação com esse poliálcool. Em contrapartida, a reação com TMP, conforme observado na Figura 9, mostra um máximo de $62,6 \pm 4,9\%$ de conversão das hidroxilas, no tempo de 72h, o que representa um resultado insatisfatório.

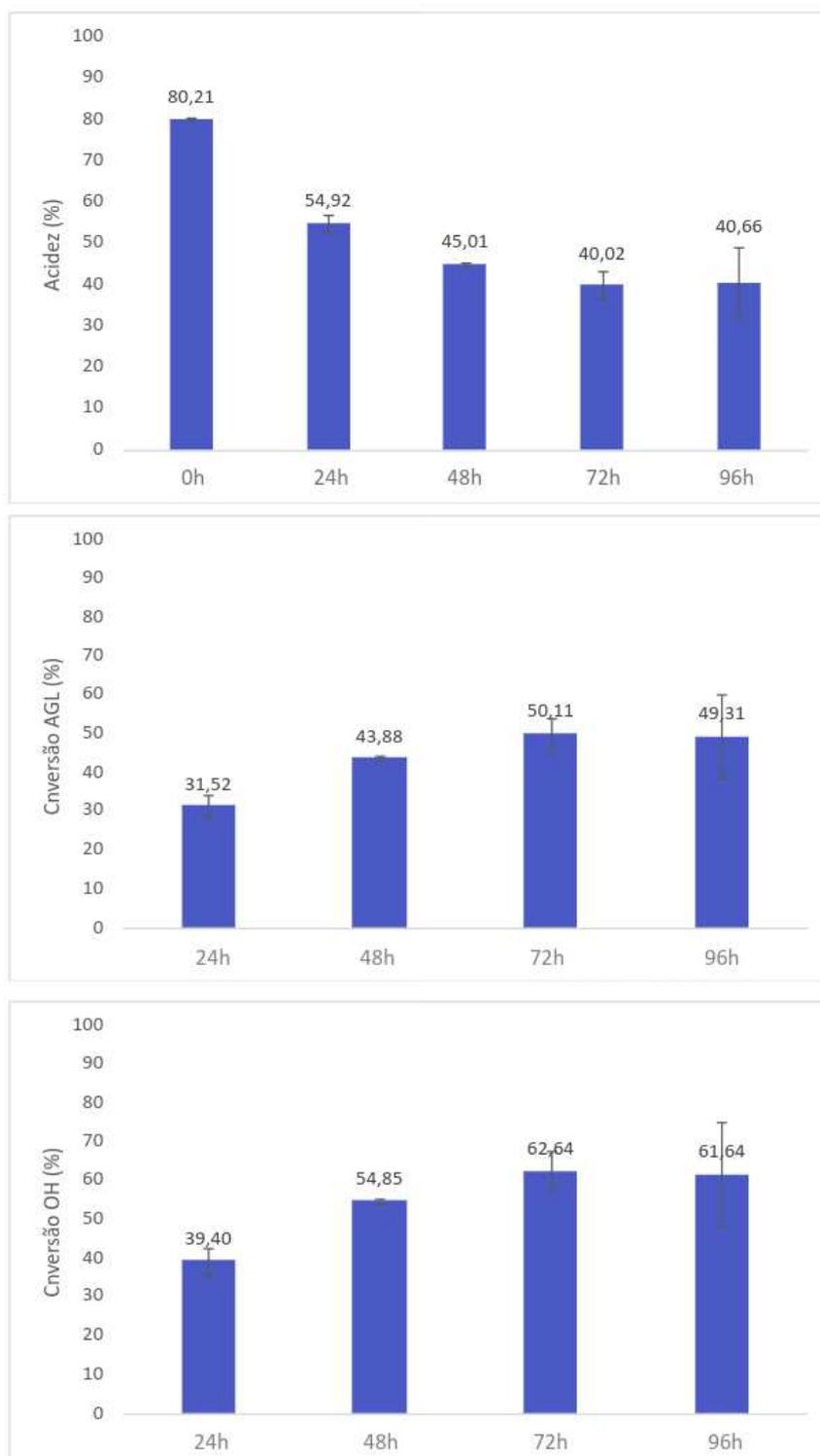


Figura 9. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando uma mistura de 50% de AGL de soja e 50% de AGL de mamona, TMP e 1% de água. Os resultados são expressos como a acidez (gráfico superior), a porcentagem de AGL esterificados (gráfico do meio) e da porcentagem de grupos hidroxila convertidos em poliésteres (gráfico inferior).

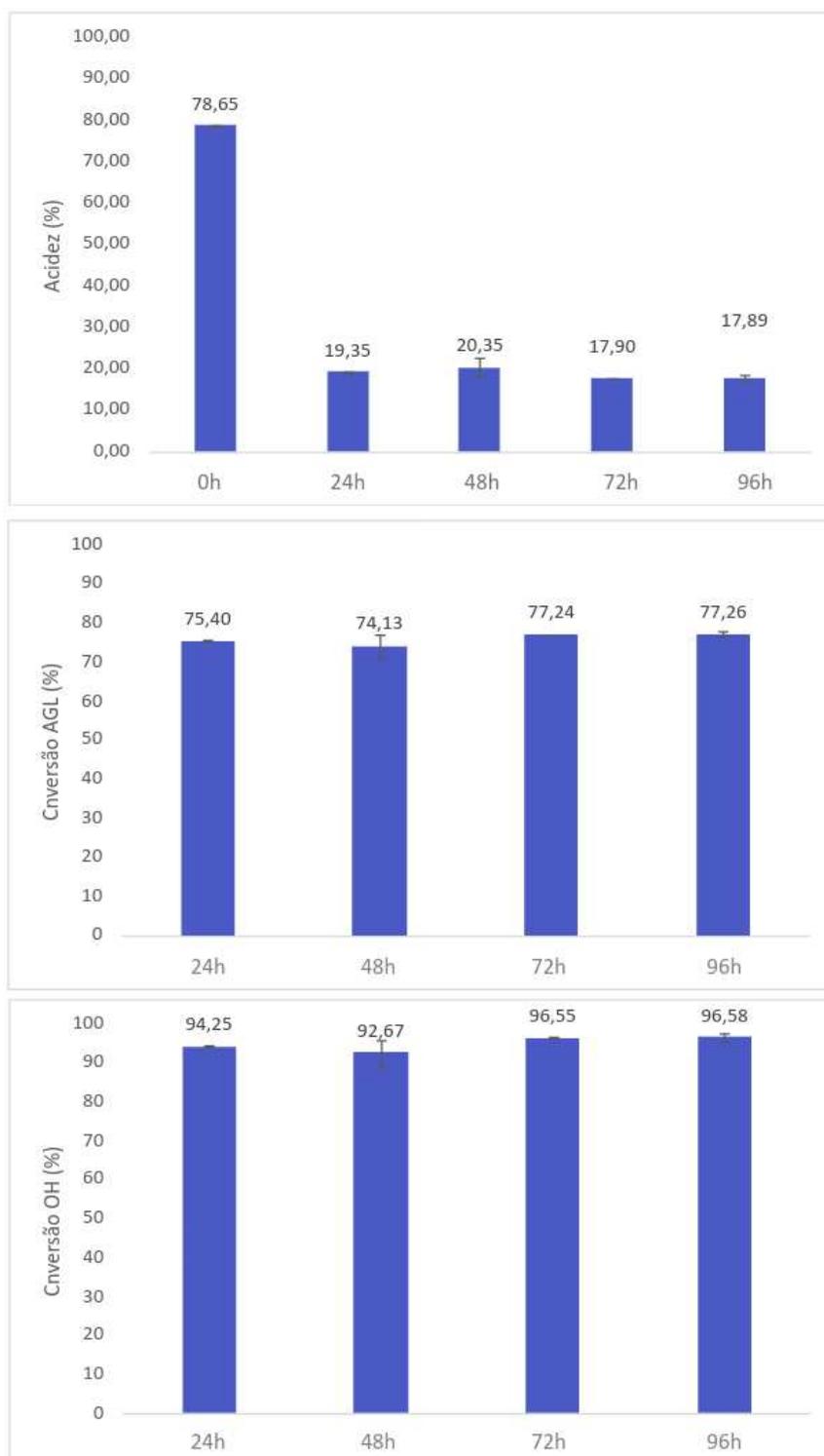


Figura 10. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando uma mistura de 50% de AGL de soja e 50% de AGL de mamona, NPG e 1% de água. Os resultados são expressos como a acidez (gráfico superior), a porcentagem de AGL esterificados (gráfico do meio) e da porcentagem de grupos hidroxila convertidos em poliésteres (gráfico inferior).

A Figura 11 destaca a discrepância na conversão entre as reações com TMP e NPG. Além disso, a Figura 10 revela que as reações com NPG alcançaram conversões satisfatórias (acima de 90%), enquanto as reações com TMP não alcançaram conversões tão próximas de 100%, como evidenciado na Figura 9 (conversões abaixo de 70%). Esse fato pode ser explicado, em parte, devido à menor solubilidade do TMP no AGL em relação ao NPG e, outra parte, devido à especificidade da enzima pelo substrato.

Essa especificidade pode estar relacionada às cadeias laterais dos aminoácidos presentes no sítio catalítico da enzima. Seria necessária uma análise mais aprofundada da estrutura da enzima utilizada, mas é possível inferir que possivelmente estão presentes aminoácidos com caráter menos polar, pois o NPG é menos polar que o TMP. Além disso, uma característica geral de proteínas globulares é a localização de resíduos hidrofóbicos no interior da proteína (nesse caso no sítio catalítico localizado embaixo da estrutura da tampa).

Outros fatores relevantes seriam o impedimento estérico presente na estrutura do TMP, maior do que o presente na estrutura do NPG, e o coeficiente de partição dos dois poliálcoois. O NPG possui um log do coeficiente de partição (n-octanol/água) em torno de 0,12, ou seja, uma substância lipofílica. Já o TMP possui um log do coeficiente de partição (n-octanol/água) em torno de -0,80, ou seja, uma substância hidrofílica (MULTICHEMIE). Possuindo mais afinidade pela água, pode ter ocorrido uma maior dificuldade de acesso ao sítio catalítico da enzima, resultando em mais baixa atividade e conversões das reações de esterificação menores se comparadas às reações com NPG.

Observando-se a Figura 11 também é possível inferir que possivelmente a reação utilizando NPG já estava em equilíbrio em 24h, então seria interessante fazer análises de acidez e conversão em tempos anteriores a 24h. Para a reação com TMP é possível que apenas duas de suas três hidroxilas tenham sido substituídas por grupamentos ésteres, dessa forma gerando conversões menos elevadas.

Dessa forma, os experimentos subsequentes foram realizados utilizando, dentre os dois poliálcoois, apenas o NPG. Uma alta conversão não só é vantajosa para otimizar o aproveitamento da matéria-prima, mas também pode eliminar a necessidade de etapas adicionais de purificação para separar os ácidos graxos não esterificados do produto final. Esta etapa adicional de purificação é tanto demorada quanto onerosa, representando um custo significativo em termos de tempo e recursos financeiros (FERNANDES et al., 2021).

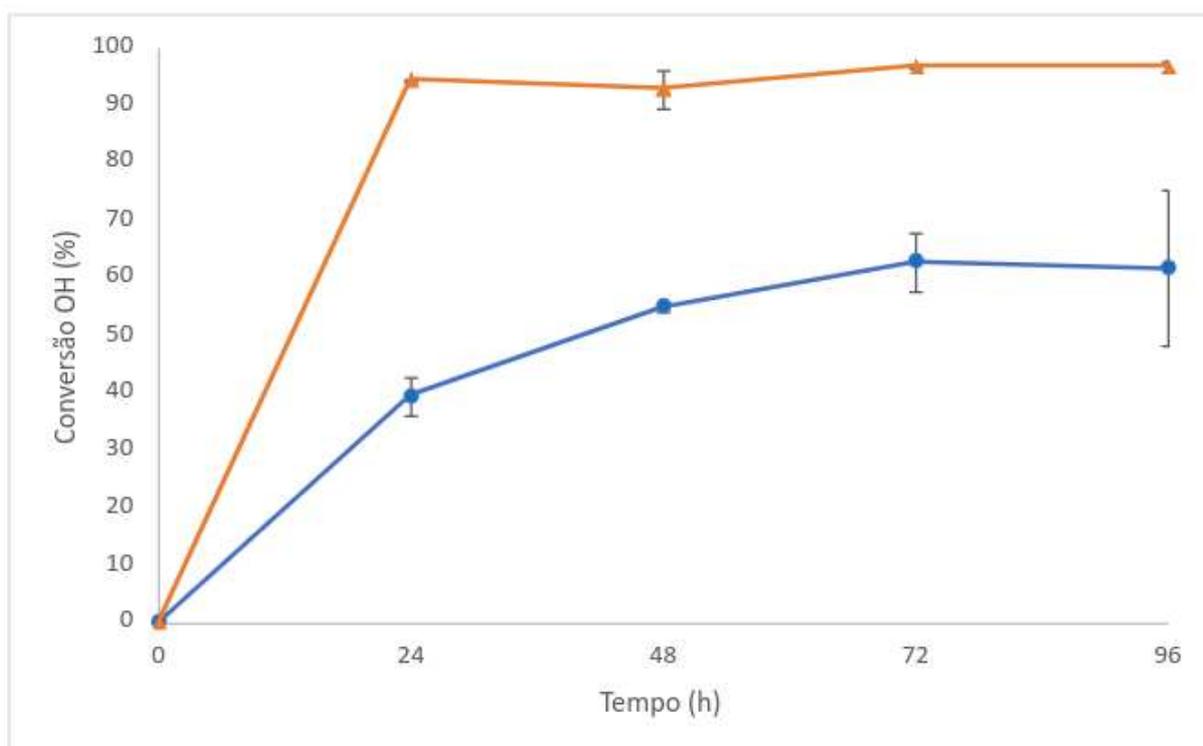


Figura 11. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando uma mistura de 50% de AGL de soja e 50% de AGL de mamona, 1% de água com NPG (▲) e TMP (●).

Ao final da reação com NPG em 24h, uma amostra do meio reacional foi analisada em relação ao perfil dos AGL remanescentes, ou seja, que permaneceram na forma livre, pois não foram incorporados aos ésteres de NPG. Essa análise foi realizada por meio de uma derivatização seletiva para os ácidos graxos na forma livre, seguida de quantificação no cromatógrafo a gás.

A metodologia cromatográfica desenvolvida por Greco-Duarte (2018) possibilita a observação dos ácidos graxos livres presentes no meio reacional e sua diminuição

ao longo da reação. No presente trabalho, essa metodologia foi empregada com o intuito de investigar se a enzima apresenta preferência por algum dos ácidos graxos da mistura reacional.

O óleo de mamona possui diversos ácidos graxos em sua composição, porém o ácido ricinoleico é o ácido graxo majoritário, com teor maior que 89% nesse óleo (MCKEON et al., 2016). Em menor proporção, são encontrados o ácido oleico, linoleico, palmítico, linolênico, esteárico e behênico (“Óleo de Mamona – Ficha Técnica | Campestre Óleos Vegetais”, 2016). No cromatograma dos AGL de mamona proveniente da hidrólise do óleo de mamona (Figura 12), é possível observar um pico principal com tempo de retenção de 8,619 minutos referente ao ácido ricinoleico.

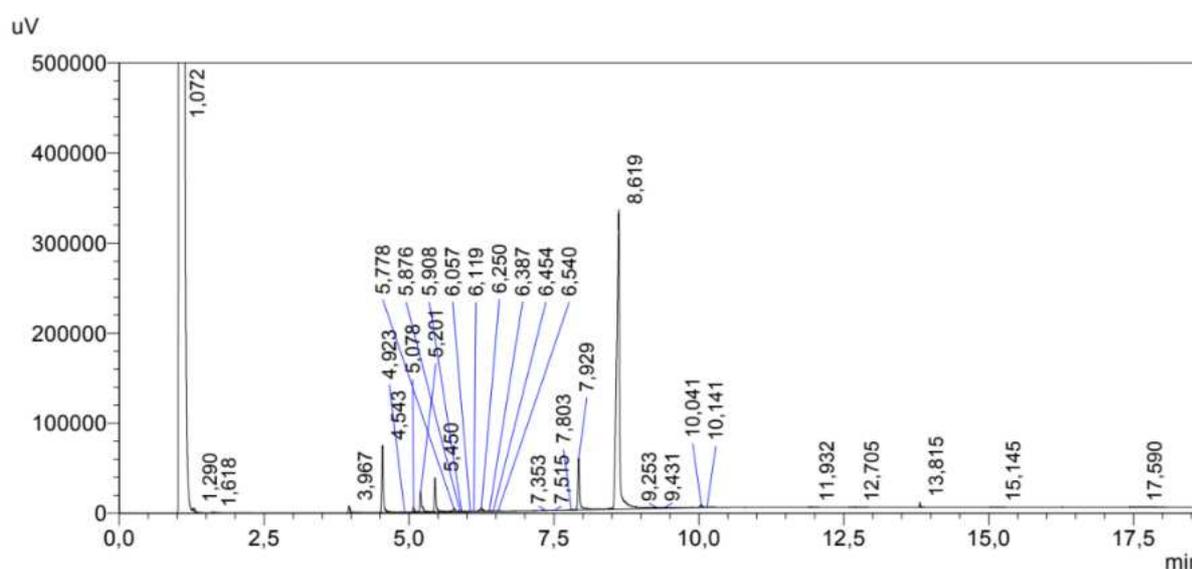


Figura 12. Cromatograma dos ácidos graxos livres do óleo de mamona, obtidos após a reação de hidrólise enzimática do óleo.

Quadro 1. Dados do cromatograma da reação de hidrólise do óleo de mamona.

Pico	Tempo de Retenção	Área	Concentração (% m/m)	Nome da Substância
1	4,543	140995	-	C:17 (PI)
2	8,619	1208177	66,7	Ácido Ricinoleico (18:1)

O óleo de soja, contém, em maior proporção, entre 25 a 60% de ácido linoleico,

seguido pelo ácido oleico com teor em torno de 20% e o ácido palmítico em torno de 10%, variando de acordo com o método e condições ambientais de cultivo. Em menor proporção também podem ser encontrados os ácidos esteárico, mirístico, linolênico (SANIBAL; MANCINI FILHO, 2004). No cromatograma dos AGL de soja, Figura 13 e Quadro 2, é possível observar dois picos principais, um de maior intensidade com tempo de retenção de 5,471 min provavelmente referente ao ácido linoleico, o ácido graxo majoritário no óleo de soja, e outro com tempo de retenção de 5,212 min possivelmente referente ao ácido oleico.

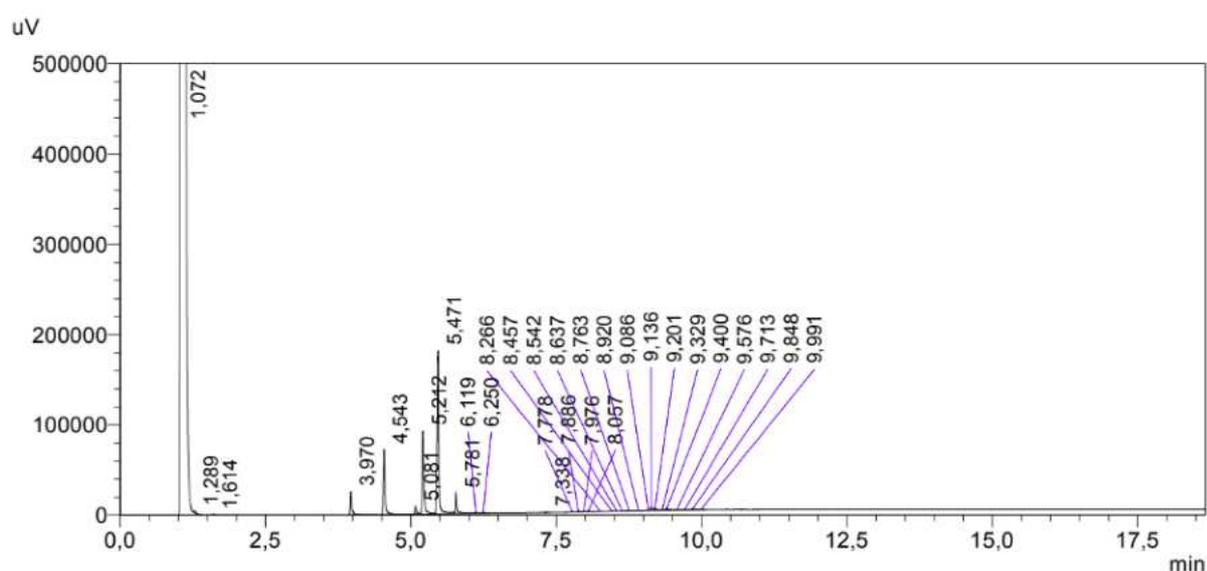


Figura 13. Cromatograma dos ácidos graxos livres do óleo de soja, obtidos após a reação de hidrólise enzimática do óleo.

Quadro 2. Dados do cromatograma da reação de hidrólise do óleo de soja.

Pico	Tempo de Retenção	Área	Concentração (% m/m)	Nome da Substância
1	4,543	139968	-	C:17 (PI)
2	5,212	182778	45,3	Ácido Oleico (18:1)
3	5,471	359927	23,0	Ácido Linoleico (18:2)

No cromatograma da reação de esterificação do NPG com a mistura dos AGL de soja e de mamona, no tempo de 24h de reação (Figura 14), é possível observar a diminuição dos picos referentes aos ácidos graxos ricinoleico, oleico e linolêico, o que indica que eles estão sendo utilizados na reação de esterificação para formação dos poliésteres. O Quadro 3 apresenta a porcentagem desses 3 ácidos graxos na forma livre, ou seja, que não foram esterificados durante a reação. Podemos observar que o ácido ricinoleico livre representa cerca de 12% da amostra, enquanto os ácidos oleico e linoleico livres representam cerca de 13%.

Esse resultado aparenta que a enzima não mostra uma preferência muito acentuada pelos ácidos graxos de soja ou de mamona. Por outro lado, seria interessante avaliar a reação nos tempos de 0h e 48h para verificar de forma mais aprofundada a especificidade enzimática.

Como a coluna utilizada foi uma coluna polar de polietilenoglicol, a ordem de eluição, como foi observado na Figura 14, foi o ácido oleico sendo eluído primeiro já que este tem apenas uma insaturação, interagindo com a fase estacionária da coluna por interação dipolo-dipolo, seguido pelo ácido linoleico que possui duas insaturações e por fim o ácido ricinoleico que possui uma insaturação e um grupo hidroxila. O ácido ricinoleico, por possuir uma hidroxila no carbono 12, interage por meio de ligação de hidrogênio com as hidroxilas da fase estacionária da coluna, além da interação dipolo-dipolo devido a insaturação no carbono 9.

Embora os resultados da cromatografia não tenham mostrado muita diferença na incorporação dos AGL de soja e de mamona pela enzima Novozym 40086 quando foi utilizada uma mistura desses AGL como substrato, os resultados das cinéticas das reações com os AGLs separados (soja e mamona não misturados) mostrou claramente que a enzima é capaz de esterificar os AGL de soja com maior velocidade, em comparação aos AGL de mamona, assim como será discutido nos tópicos abaixo (4.4.2 e 4.4.3).

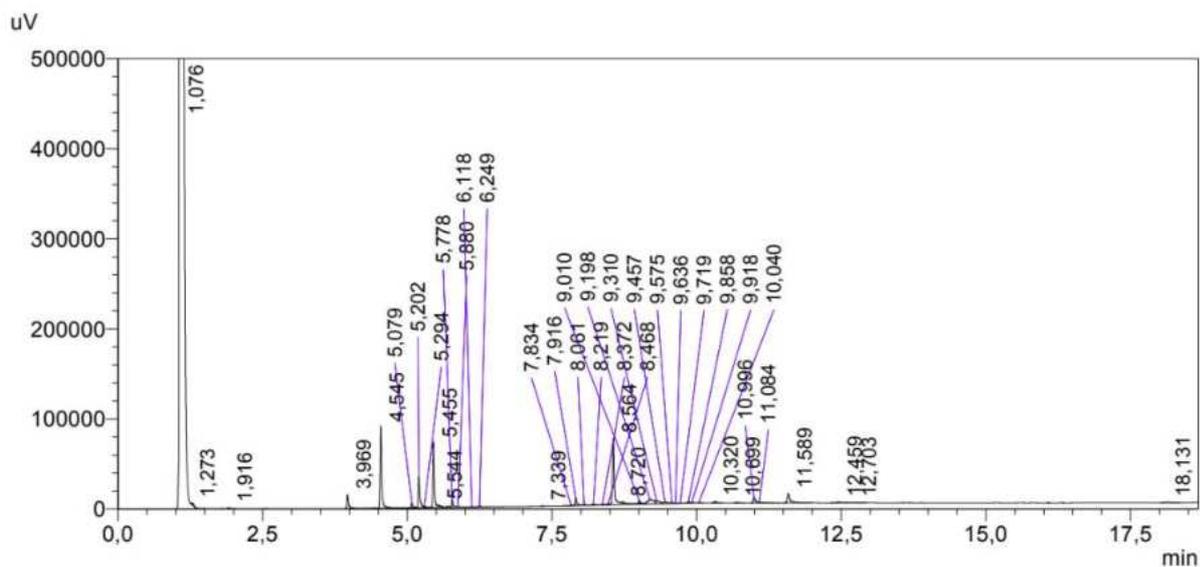


Figura 14. Cromatograma da reação de esterificação utilizando NPG, 1% de água e a mistura de 50% de AGLM e AGLS como substrato (tempo de 24h de reação).

Quadro 3. Dados do cromatograma da reação de esterificação utilizando NPG, 1% de água e a mistura de 50% de AGLM e AGLS no tempo de 24h.

Pico	Tempo de Retenção	Área	Concentração (% m/m)	Nome da Substância
1	4,545	172259	-	C:17 (PI)
2	5,202	70867	4,6	Ácido Oleico (18:1)
3	5,455	133438	8,7	Ácido Linoleico (18:2)
4	8,564	185346	12,1	Ácido Ricinoleico (18:1)

4.4.2 Substrato: AGL do Óleo de Mamona

A fim de compreender a cinética da reação de esterificação dos AGL de mamona (sem mistura com os AGL de soja), foi realizada uma reação de esterificação destes com NPG catalisada pela lipase Novozym 40086 e o resultado está apresentado nas Figuras 15 e 16. Para a reação utilizando apenas os AGL de mamona, em 48h pôde ser observado uma estagnação da acidez, indicando que a reação de esterificação estaria em equilíbrio. Em 48h, o meio reacional apresentou acidez de $20,85 \pm 0,03\%$, o que corresponde à conversão de $89,80 \pm 0,01\%$ das hidroxilas.

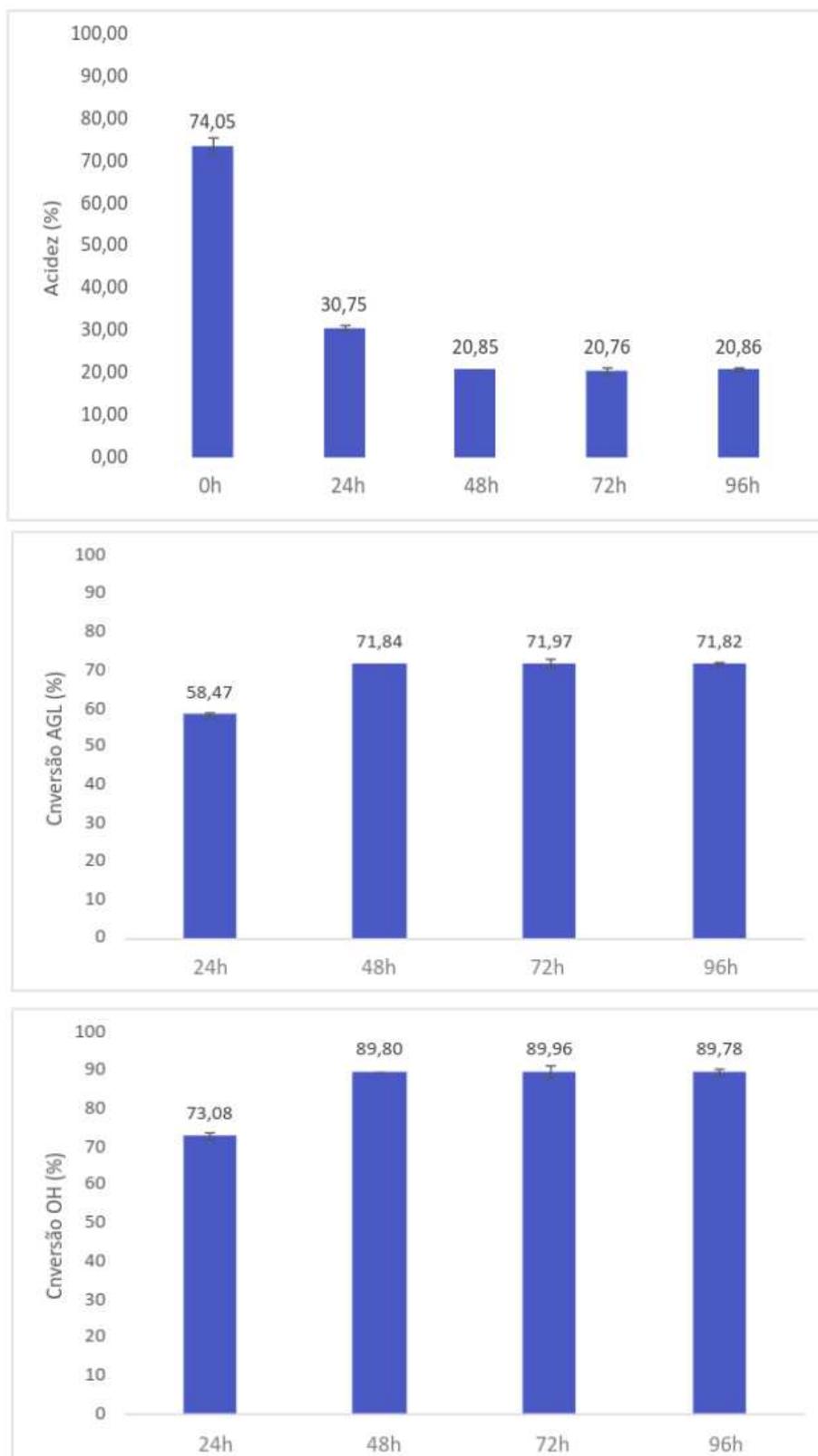


Figura 15. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando AGL de mamona, NPG e 1% de água. Os resultados são expressos como a acidez (gráfico superior), a porcentagem de AGL esterificados (gráfico do meio) e da porcentagem de grupos hidroxila convertidos em poliésteres (gráfico inferior).

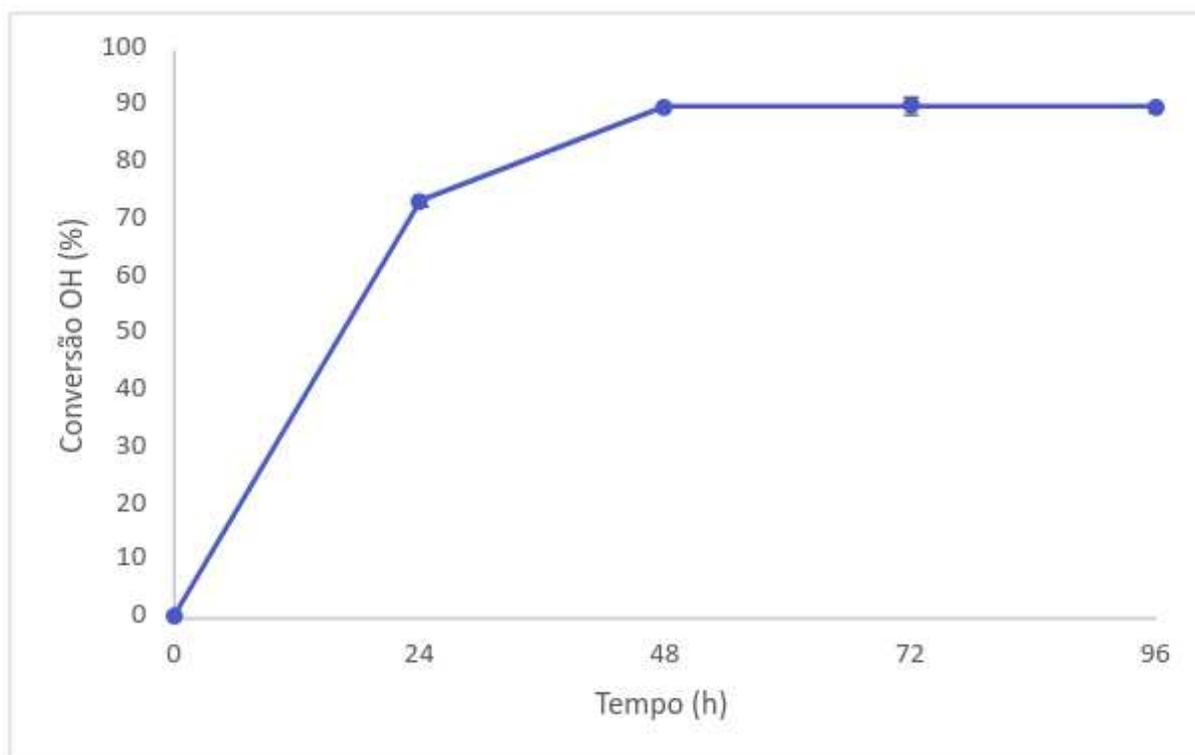


Figura 16. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando AGL de mamona, 1% de água e NPG.

4.4.3 Substrato: AGL do Óleo de soja

Com o objetivo de compreender a cinética da reação de esterificação dos AGL de soja sem a mistura com os de mamona, foi realizada a reação e os resultados estão apresentados nas Figuras 17 e 18. As reações utilizando os AGL de soja apresentaram em 48h acidez de $19,3 \pm 0,8\%$ e em 72h acidez de $20,2 \pm 0,8\%$, como pode ser observado na Figura 17, gráfico superior. Pela Figura 17, no gráfico inferior, é possível observar que em 24h a reação já estava próxima do equilíbrio (de $91,4 \pm 1,0\%$ para $96,4 \pm 1,1\%$), diferentemente da reação com os AGL de mamona que apresentaram significativa mudança de 24h para 48h (de $73,1 \pm 0,9\%$ para $89,80 \pm 0,01\%$). Vale ressaltar também as diferenças na hidrólise do óleo de soja e mamona. A hidrólise do óleo de soja produziu um óleo com 95,02% de acidez enquanto a hidrólise do óleo de mamona produziu um óleo com 88,16% de acidez. A eficiência

das hidrólises também pode ter afetado a cinética das reações de esterificação.

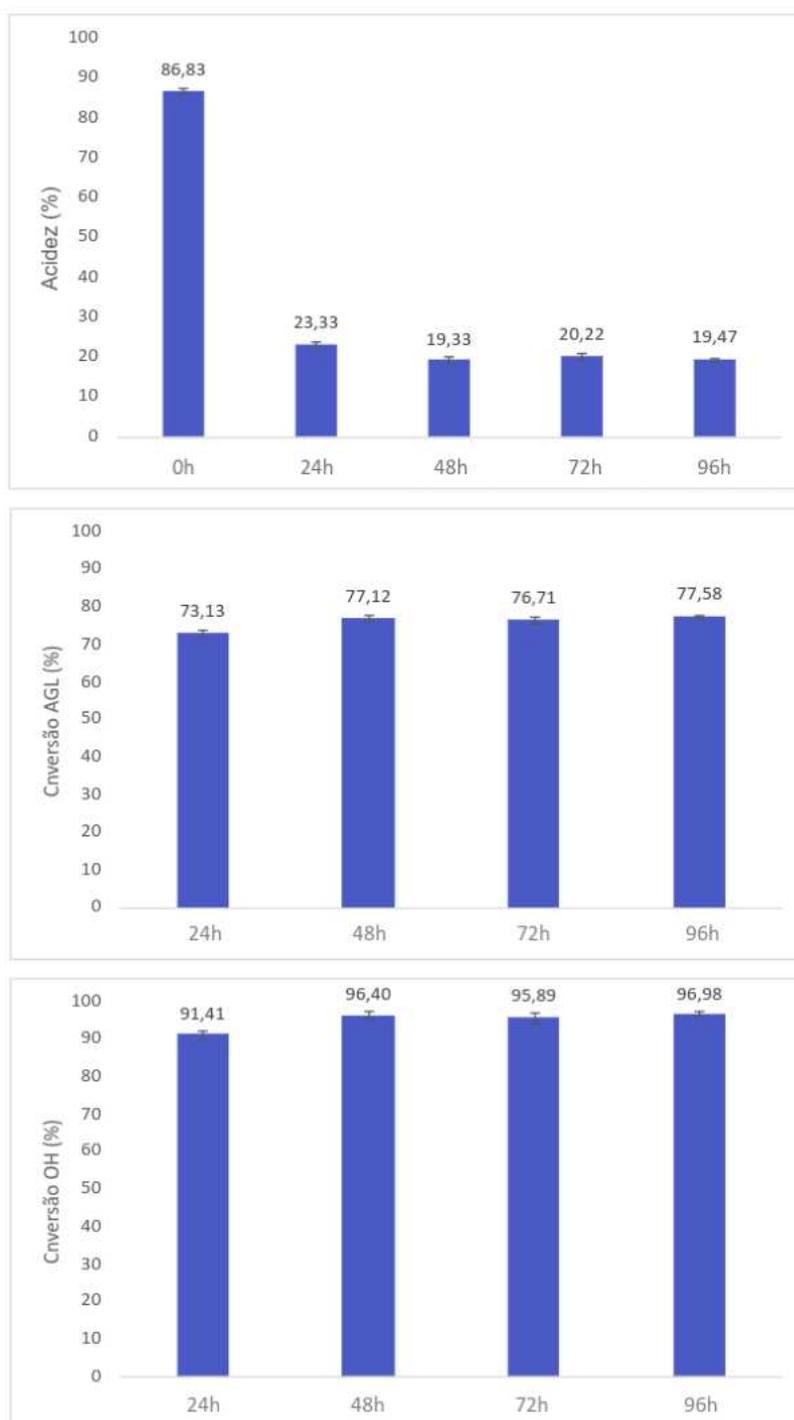


Figura 17. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando AGL de soja, NPG e 1% de água. Os resultados são expressos como a acidez (gráfico superior), a porcentagem de AGL esterificados (gráfico do meio) e da porcentagem de grupos hidroxila convertidos em poliésteres (gráfico inferior).

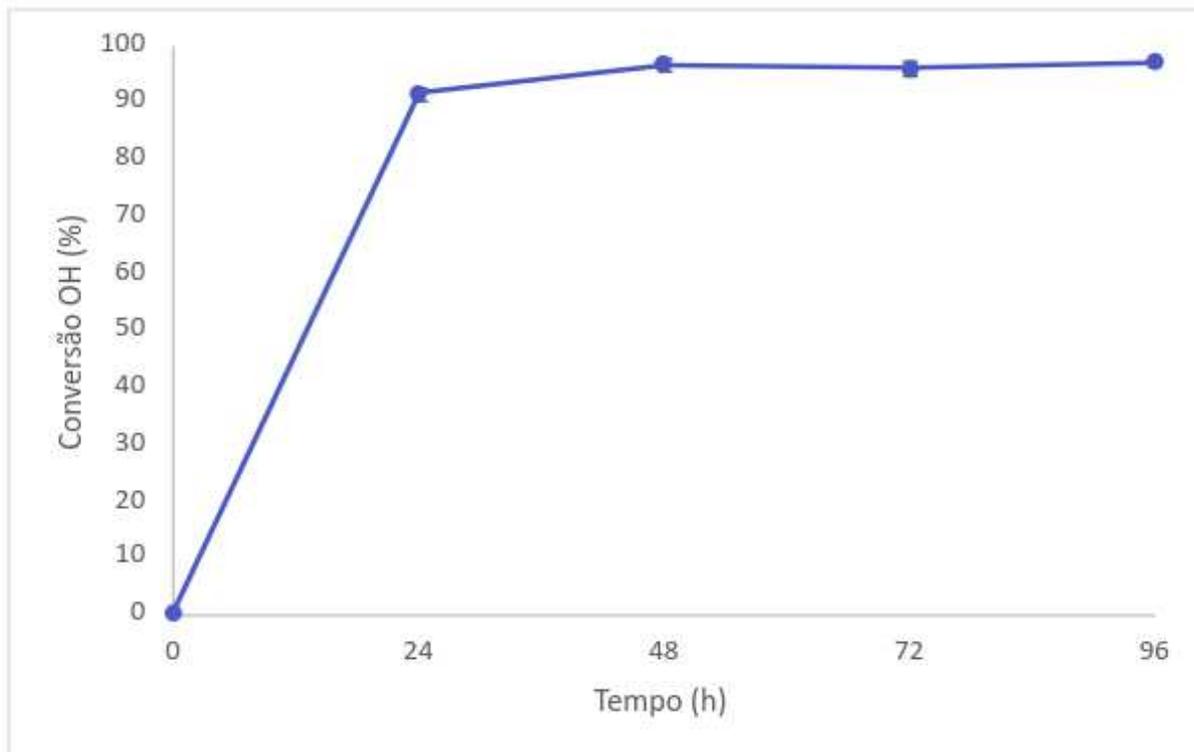


Figura 18. Reação de síntese de poliésteres catalisada pela Novozym 40086 utilizando AGL de soja, 1% de água e NPG.

5. CONCLUSÃO

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a hidrólise enzimática tanto do óleo de soja quanto do óleo de mamona demonstrou ser um método eficiente para a produção de ácidos graxos livres (AGLs), matérias-primas para síntese dos biolubrificantes. Os resultados obtidos foram comparáveis aos de estudos anteriores, indicando a viabilidade e reprodutibilidade do processo.

Ao analisar a influência do teor de água na produção dos biolubrificantes por reação de esterificação, observou-se que a adição de água em baixas concentrações (1%) proporcionou uma melhor solubilização dos poliálcoois e atividade enzimática possivelmente pela ativação interfacial, resultando em altas conversões dos AGLs em ésteres de poliál. No entanto, concentrações mais elevadas de água mostraram-se desfavoráveis, possivelmente devido ao favorecimento da reação inversa (hidrólise) já que a água é um produto da reação.

A análise da cinética da reação de esterificação revelou que as reações

utilizando AGLs de soja resultaram em maiores valores de conversão (>90%) e eficiência. Isso pode sugerir uma maior afinidade da enzima pelos AGL provenientes do óleo de soja se comparados com os do óleo de mamona, mas também pode ter relação com a eficiência das duas hidrólises.

Além disso, ao utilizar uma mistura dos AGLs de soja e mamona como substrato, observou-se que a enzima foi capaz de esterificar ambos os ácidos graxos de forma relativamente equilibrada, sem uma preferência significativa por um em detrimento do outro. No entanto, a esterificação dos AGLs de soja ocorreu com maior velocidade, indicando uma vantagem prática na utilização desse substrato.

Portanto, os resultados deste estudo fornecem insights importantes para o desenvolvimento de processos otimizados de produção de biolubrificantes a partir dessas oleaginosas, contribuindo para a busca por alternativas sustentáveis na indústria de lubrificantes.

6. PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar análises cromatográficas (CG) no tempo de reação de 0h e 48h e estudar de forma mais aprofundada a especificidade enzimática.

- ✓ Produzir os biolubrificantes em maior escala visando avaliar propriedades físico-químicas relevantes dos lubrificantes utilizando diferentes proporções de cada óleo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Resolução nº 804/2019**, de 12 de dezembro de 2019. Dispõe sobre os critérios para obtenção do registro de graxas e óleos lubrificantes e as responsabilidades e obrigações dos detentores de registro, produtores e importadores. Disponível em: <<https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-804-2019-dispoe-sobre-os-criterios-para-obtencao-do-registro-de-graxas-e-oleos-lubrificantes-e-as-responsabilidades-e-obrigacoes-dos-detentores-de-registro-produtores-e-importadores?origin=instituicao>>. Acesso em: 14 de abr. 2024.

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, dez. 2017.

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, abr. 2020.

American Petroleum Institute (API). **API 1509**, de outubro de 2023, 2a edição. Disponível em: <<https://www.api.org/-/media/Files/Certification/Engine-Oil-Diesel/Publications/API%201509-%2022nd%20Edition.pdf>>. Acesso em: 15 abr. 2024.

BART, J. C. J.; GUCCIARDI, E.; CAVALLORO, S. (EDS.). **Biolubricants: science and technology**. Cambridge, UK ; Philadelphia, PA: Woodhead Publishing, 2013.

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

BONDIOLI, P.; DELLA BELLA, L.; MANGLAVITI, A. Synthesis of biolubricants with

high viscosity and high oxidation stability. **Oléagineux, Corps gras, Lipides**, v. 10, n. 2, p. 150–154, mar. 2003.

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

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, v. 215, p. 705–713, mar. 2018.

Conab - Com novo recorde, produção de grãos na safra 2022/23 chega a 322,8 milhões de toneladas. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/5157-com-novo-recorde-producao-de-graos-na-safra-2022-23-chega-a-322-8-milhoes-de-toneladas>>. Acesso em: 17 abr. 2024.

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, dez. 2015.

FERNANDES, K. V. et al. Enzymatic esterification of palm fatty-acid distillate for the production of polyol esters with biolubricant properties. **Industrial Crops and Products**, v. 116, p. 90–96, jun. 2018.

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**, v. 362, p. 122–129, fev. 2021.

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

GRECO-DUARTE, Jaqueline. **Produção e caracterização de um novo biolubrificante obtido por hidroesterificação enzimática a partir do óleo de mamona.** Orientador: Denise Maria Guimarães Freire. Coorientador: José André Cavalcanti da Silva. 239 p. Tese (Doutorado em bioquímica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <https://ppgbq.iq.ufrj.br/wp->

content/uploads/pesquisa/teses/2018/Tese%20Jaqueline%20Greco%20Duarte.pdf.
Acesso em: 9 mar. 2024.

GRECO-DUARTE, J. et al. Understanding the degree of estolide enzymatic polymerization and the effects on its lubricant properties. **Fuel**, v. 245, p. 286–293, jun. 2019.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, J.; BENAIGES, M. D.; VALERO, F. Rhizopus oryzae Lipase, a Promising Industrial Enzyme: Biochemical Characteristics, Production and Biocatalytic Applications. **Catalysts**, v. 10, n. 11, p. 1277, 3 nov. 2020.

MCKEON, T. A. et al. (EDS.). **Industrial oil crops**. London, UK: Academic Press is an imprint of Elsevier, 2016.

MOULOUGUI, Z.; PELET, S. Study of the acyl transfer reaction: Structure and properties of glycerol carbonate esters. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 103, n. 4, p. 216–222, abr. 2001.

MULTICHEMIE. **FISPQ**. Disponível em <<https://www.multichemie.com.br/>> Acesso em: 20 maio. 2024.

Óleo de Mamona – Ficha Técnica | Campestre Óleos Vegetais. , 24 out. 2016. Disponível em: <<https://www.campestre.com.br/oleos-vegetais/oleo-de-mamona/oleo-de-mamona-ficha-tecnica/>>. Acesso em: 6 abr. 2024.

PAULI, Evandro Armini de; ULIANA, Fernando Saulo. **Lubrificação - Mecânica**. SENAI, 1997.

SANIBAL, E. A. A.; MANCINI FILHO, J. Perfil de ácidos graxos trans de óleo e gordura hidrogenada de soja no processo de fritura. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 27–31, mar. 2004.

SILVA, C. E.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; MANDARINO, J. M. G.; OLIVEIRA, M. A.; LEITE, R. S.; OLIVEIRA, G. B. A.; MOREIRA, A. A.; SANTOS, H. M. C.; MÔNACO, A. P. A. Avaliação de ácidos graxos da soja: grão inteiro, casca, cotilédones e hipocótilo. *In*: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 5., 2010, Londrina. Resumos... Londrina: **Embrapa Soja**, 2010. p. 31-34. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/71981/1/ID-30950.pdf>.

Acesso em: 19 mar. 2024.

SILVA, José Alberto Batista da. **Produção de Biodiesel e Biolubrificantes: Avaliação de Novos Catalisadores e Antioxidantes Naturais**. Orientadora: Luciene da Silva Santos. Coorientadora: Dulce Maria de Araújo Melo. 2019. 340 p. Tese (Doutorado em química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Rio Grande do Norte, 2019. Disponível em: https://repositorio.ufrn.br/bitstream/123456789/27732/1/Produ%C3%A7%C3%A3obiodieselbiolubrificantes_Silva_2019.pdf. Acesso em: 13 abr. 2024.

SILVA, José André Cavalcanti da; FREIRE, Denise Maria Guimarães; "Produção de biolubrificantes catalisada por lipases: fundamentos e aplicações", p. 471 -502. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017. ISBN: 9788521211150, DOI 10.5151/9788521211150-13.