

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA

Renata Ramos Pereira



**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO FERMENTADO
SÓLIDO COM ATIVIDADE LIPÁSICA**

Rio de Janeiro

2025

Renata Ramos Pereira

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO FERMENTADO
SÓLIDO COM ATIVIDADE LIPÁSICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola de Química da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Engenheira Química.

Orientadora: Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras

Coorientadora: Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro

2025

CIP - Catalogação na Publicação

P394p Pereira, Renata Ramos
PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO
FERMENTADO SÓLIDO COM ATIVIDADE LIPÁSICA / Renata
Ramos Pereira. -- Rio de Janeiro, 2025.
51 f.

Orientadora: Erika Cristina Gonçalves Aguieiras.
Coorientadora: Denise Maria Guimarães Feire.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) -
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de
Química, Bacharel em Engenharia Química, 2025.

1. Integração de processos. 2. Produção de
biodiesel. 3. Etanol de milho. 4. Biocatalisador.
I. Aguieiras, Erika Cristina Gonçalves, orient. II.
Feire, Denise Maria Guimarães, coorient. III. Título.

Renata Ramos Pereira

**PRODUÇÃO DE BIODIESEL DE ÓLEO DE MILHO UTILIZANDO FERMENTADO
SÓLIDO COM ATIVIDADE LIPÁSICA**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Escola de Química da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do grau de Engenheira Química.

Rio de Janeiro, 27 de Março de 2025.

Prof^a. Erika Cristina Gonçalves Aguiéiras – Orientadora
Universidade Federal do Rio de Janeiro (Campus UFRJ Duque de Caxias)

Agradecimento

Gostaria de começar agradecendo às pessoas que tornaram tudo isso possível e que, sem medir esforços, sempre estiveram ao meu lado, me ajudando e apoiando em cada passo: meus pais. Sou imensamente grata por todo o amor, incentivo e dedicação incondicional ao longo dessa jornada.

Agradeço à minha irmã, Fernanda, que teve um papel importante na minha escolha por Engenharia Química na UFRJ e esteve presente em cada etapa da minha trajetória, sempre tão compreensiva e encorajadora, me dando força e me apoiando ao longo do caminho. Agradeço também ao meu cunhado, Victor, que me acompanhou desde antes mesmo da faculdade, participando e sendo essencial em cada etapa da minha graduação.

Um agradecimento especial ao meu namorado, Gabriel, por todo o apoio, parceria e paciência nos desafios finais da graduação, sendo sempre tão compreensivo e carinhoso.

Também, quero agradecer aos amigos que fiz durante essa caminhada, minha gratidão por tornarem essa longa e desafiadora jornada mais leve, agradável e divertida. Em especial, agradeço a Tainah, Bia, Letícia, Léo, Pedro, Arthur, ao time de handebol e à gestão de 2022 da Atlética da Engenharia da UFRJ. A convivência, as trocas e os momentos compartilhados foram essenciais para tornar essa experiência ainda mais especial.

Por fim, mas não menos importante, expresso minha gratidão ao Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química da UFRJ, onde tive a oportunidade de realizar minha iniciação científica. Esse período foi fundamental para minha formação, proporcionando aprendizado prático e desenvolvimento acadêmico. Agradeço imensamente às minhas orientadoras Érika, Jaqueline e Denise, por toda dedicação e ensinamentos ao longo do projeto.

Além disso, agradeço à Agência Nacional de Petróleo, Gás e Biocombustíveis (ANP) pelo apoio financeiro à pesquisa, por meio do projeto realizado em parceria com a Sinochem LTDA. Esse suporte foi fundamental para a concretização deste trabalho.

Muito obrigada!

Resumo

Ramos Pereira, Renata. Produção de Biodiesel de Óleo de Milho Utilizando Fermentado Sólido com Atividade Lipásica. Rio de Janeiro, 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

Este estudo avaliou a síntese enzimática de ésteres etílicos de ácidos graxos utilizando coprodutos da produção de etanol de milho, com foco no óleo de milho de destilaria (OMD), sob diferentes condições reacionais. O biocatalisador utilizado foi o preparado enzimático sólido (PES) com atividade lipásica, obtido a partir de fermentação em estado sólido (FES) do fungo *Rhizomucor miehei* em grãos secos de destilaria com solúveis (GSDS). Os experimentos foram conduzidos para otimizar a etanolise do OMD, avaliando diferentes razões molares e grau de hidratação do etanol. As condições avaliadas incluíram etanol 95% e 99,8%, com razões molares etanol:triacilglicerol (TAG) de 3:1 e 6:1 (batelada simples e alimentada), e a adição de etanol foi realizada tanto de forma total quanto em etapas nos tempos 0 h e 24 h. Os melhores resultados foram obtidos com etanol 95% e razão molar 3:1 em batelada simples, levando a um maior rendimento de ésteres (65%). Além disso, foram realizadas reações consecutivas utilizando um produto com 48,8% de teor de éster, com o objetivo de alcançar um teor mínimo de éster exigido pelas especificações do biodiesel. Com essa estratégia, foi possível obter um aumento de 20% no teor de éster em relação à primeira reação, resultando em uma acidez final de 1,3%. A adição de 2% em massa de Novozym 435 ao sistema aprimorou ainda mais o rendimento de ésteres, ultrapassando 95% após três reações consecutivas. O reuso do biocatalisador também foi avaliado em reações de esterificação com ácido oleico. Para isso, o biocatalisador foi lavado com etanol 95% e hexano antes de ser reutilizado. Apesar de ser observada uma redução na conversão ao longo dos ciclos, o biocatalisador manteve alta eficiência até o quarto ciclo de reuso, independentemente do solvente de lavagem utilizado, demonstrando seu potencial para aplicações industriais. O reuso do biocatalisador também foi testado com o OMD, no entanto, o experimento não apresentou o resultado esperado, havendo perda da atividade enzimática já no primeiro reuso. Os resultados demonstram o potencial do OMD como uma matéria-prima viável para a produção de biodiesel dentro de um conceito integrado de biorrefinaria. A avaliação das condições reacionais, a aplicação de estratégias de reações consecutivas e o reuso do biocatalisador mostraram-se eficazes para melhorar as taxas de conversão e a eficiência do processo.

Palavras-chave: biocombustíveis, biodiesel, milho, integração de processos, lipase, desenvolvimento sustentável, eficiência energética.

Abstract

Ramos Pereira, Renata. Produção de Biodiesel de Óleo de Milho Utilizando Fermentado Sólido com Atividade Lipásica. Rio de Janeiro, 2025. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2025.

This study evaluated the enzymatic synthesis of ethyl esters of fatty acids using by-products from corn ethanol production, focusing on distillers corn oil (DCO), under different reaction conditions. The biocatalyst used was a solid enzymatic preparation (SEP) with lipase activity, obtained through solid-state fermentation (SSF) of the fungus *Rhizomucor miehei* on dried distillers grains with solubles (DDGS). The experiments were conducted to optimize the ethanolysis of DCO by evaluating different molar ratios and the hydration level of ethanol. The conditions tested included 95% and 99.8% ethanol, with ethanol:triacylglycerol (TAG) molar ratios of 3:1 and 6:1 (simple and fed-batch), and ethanol addition was performed either all at once or in steps at 0 h and 24 h. The best results were obtained using 95% ethanol and a 3:1 molar ratio in a simple batch, leading to a higher ester yield (65%). In addition, consecutive reactions were carried out using a product with 48.8% ester content, aiming to reach the minimum ester content required by biodiesel specifications. With this strategy, it was possible to obtain a 20% increase in ester content compared to the first reaction, resulting in a final acidity of 1.3%. The addition of 2% w/w Novozym 435 to the system further improved ester yield, exceeding 95% after three consecutive reactions. The reuse of the biocatalyst was also evaluated in esterification reactions with oleic acid. For this purpose, the biocatalyst was washed with 95% ethanol and hexane before being reused. Although a decrease in conversion was observed over the cycles, the biocatalyst maintained high efficiency up to the fourth reuse cycle, regardless of the washing solvent used, demonstrating its potential for industrial applications. The reuse of the biocatalyst was also tested with DCO; however, the experiment did not show the expected results, with a loss of enzymatic activity already observed after the first reuse. The results demonstrate the potential of DCO as a viable feedstock for biodiesel production within an integrated biorefinery concept. The evaluation of reaction conditions, the application of consecutive reaction strategies, and the reuse of the biocatalyst proved effective in improving conversion rates and process efficiency.

Keywords: Biofuels, biodiesel, corn, process integration, lipase, sustainable development, energy efficiency.

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma da integração dos processos de produção de etanol e biodiesel.

Figura 2: Representação da reação química básica para a produção de etanol a partir da glicose.

Figura 3: Figura do esquema de reação de transesterificação.

Figura 4: Figura do esquema de reação de esterificação

Figura 5: Avaliação do PES de fermentações de 48 e 72 horas a 30, 35 e 40°C em biorreatores do tipo bandeja. Condições das reações: razão molar etanol hidratado:ácido oleico 1:1, 20% de PES a 45°C.

Figura 6: Efeitos da razão molar etanol:TAG e da concentração de etanol na síntese de ésteres etílicos (45°C) a partir de OMD catalisada por PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS. (1) PES 20% em peso, etanol 95%, razão molar etanol:TAG 3:1. (2) PES 20% em peso, etanol 95%, razão molar etanol:TAG 6:1 ($\frac{1}{2}$ no tempo 0h e $\frac{1}{2}$ em 24h). (3) PES 20% em peso, etanol 99,8%, razão molar etanol:TAG 3:1. (4) PES 20% em peso, etanol 99,8%, razão molar etanol:TAG 6:1 ($\frac{1}{2}$ no tempo 0h e $\frac{1}{2}$ em 24h).

Figura 7: Teor de ésteres na etanólise do OMD em reator batelada (45°C), catalisada pelo FES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (30% em massa), com razão molar etanol hidratado:AGL de 4:1 e adição de etanol em 0h ou em etapas (1/4 em 0h, 1/4 em 1,5h e 2/4 em 4h).

Figura 8: Acidez da etanólise do OMD em reator batelada (45°C), catalisada pelo PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (30% em massa), com razão molar etanol hidratado:AGL de 4:1 e adição de etanol em 0h ou em etapas (1/4 em 0h, 1/4 em 1,5h e 2/4 em 4h).

Figura 9: Reação consecutiva de etanólise de OMD em reator batelada (45°C) catalisada por PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (20% em peso) com razão molar etanol hidratado:TAG de 3:1 na primeira reação e 3:1 ou 6:1 na segunda reação.

Figura 10: Teor de éster na reação do OMD catalisada pelo PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (20% em massa) em combinação com Novozym 435 (2% em massa).

Condição da reação consecutiva: razão molar etanol:TAG de 3:1 (com adição fracionada de etanol, 1/2 em 0h e 1/2 em 4h) a 45 °C por 24h.

Figura 11: Teor de éster na reação do OMD catalisada pelo PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (20% em massa) em combinação com Novozym 435 (2% em massa) na terceira reação consecutiva. Condição da reação: razão molar etanol:TAG remanescente de 3:1 (com adição fracionada de etanol, 1/2 em 0h e 1/2 em 4h) a 45 °C por 24h.

Figura 12: Capacidade de esterificação do PES reutilizado de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS, lavado com etanol anidro ou hexano. Condição da reação: razão molar etanol:ácido oleico de 1:1, 20% em massa de PES a 45 °C por 4h.

Figura 13: Teor de éster na reação do OMD catalisada pelo PES reutilizado de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS. Condição da reação: razão molar etanol:TAG de 4:1 (com adição fracionada de etanol, 1/2 em 0h e 1/2 em 4h), 20% em massa de PES a 45 °C por 24h.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Matérias - primas utilizadas na produção de biodiesel (B100)

Tabela 2: Comparaçao das produtividades na fermentação em estado sólido (FES) em biorreatores do tipo bandeja com *R. miehei* após 48 e 72 horas de fermentação a 30, 35 e 40°C.

Listas de Siglas

| | |
|----------------|--|
| Abiove | Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais |
| ANP | Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis |
| ASTM | American Society for Testing and Materials |
| BNDES Setorial | Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social - Setorial |
| CNA | Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil |
| CNP | Conselho Nacional de Política Energética |
| CONAB | Companhia Nacional de Abastecimento |
| OMD | Óleo de Milho de Destilaria |
| GSDS | Grãos Secos de Destilaria com Solúveis |
| Embrapa | Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária |
| EN | European Standard |
| FAPESP | Fundaçao de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo |
| GEE | Gases de Efeito Estufa |
| IFRN | Instituto Federal do Rio Grande do Norte |
| OECD/FAO | Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico / Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| PNPB | Plano Nacional de Produção e Uso de Biocombustíveis |
| PRIO Paulo | Programa de Pesquisa em Biocombustíveis da Universidade de São |
| UE | União Europeia |
| UFSCar | Universidade Federal de São Carlos |
| UDOP | União dos Produtores de Bioenergia |
| ÚNICA | União da Indústria de Cana-de-Açúcar |
| FES | Fermentação em Estado Sólido |
| PES | Preparado Enzimático Sólido |

Sumário

| | | |
|----------|--|----|
| 1. | Introdução | 11 |
| 2. | Revisão Bibliográfica | 14 |
| 2.1. | Etanol | 14 |
| 2.2. | Etanol de milho | 15 |
| 2.2.1. | Coprodutos da produção de etanol de milho | 16 |
| 2.2.1.1. | Grãos Secos de Destilaria com Solúveis (GSDS) | 16 |
| 2.2.1.2. | Óleo de Milho de Destilaria (OMD) | 17 |
| 2.3. | Biodiesel | 17 |
| 2.3.1. | Consumo e Produção | 18 |
| 2.3.2. | Matéria-prima e processo de produção | 20 |
| 2.4. | Biodiesel de milho | 22 |
| 2.4.1. | Catalisadores | 23 |
| 2.4.2. | Lipases | 25 |
| 2.4.2.1. | Produção de lipases por fermentação em estado sólido | 25 |
| 3. | Materiais | 27 |
| 4. | Metodologia | 28 |
| 4.1. | Reações de esterificação e transesterificação | 28 |
| 4.2. | Determinação da acidez | 29 |
| 4.3. | Determinação do teor de éster etílico | 30 |
| 5. | Resultados | 31 |
| 5.1. | Influência da temperatura de fermentação na capacidade sintética do biocatalisador | 31 |
| 5.2. | Reações de transesterificação do OMD - influência do grau de hidratação do etanol e da razão molar | 32 |
| 5.3. | Reações consecutivas | 33 |
| 5.4. | Reutilização do biocatalisador | 41 |
| 6. | Conclusão | 44 |
| 7. | Referência Bibliográfica | 45 |

1. Introdução

A busca por fontes de energia renováveis está ganhando força, impulsionando investimentos significativos em biocombustíveis, como o etanol e o biodiesel. O objetivo é substituir ou complementar os combustíveis fósseis tradicionais, que vêm sendo questionados devido às suas implicações ambientais. A crescente preocupação com o meio ambiente e a necessidade de reduzir a emissão de gases de efeito estufa têm levado países de todo o mundo a adotar políticas de incentivo à produção e ao consumo de combustíveis renováveis, buscando uma matriz energética mais sustentável e economicamente viável (ANP, 2024).

Nesse contexto, o etanol se destaca como um dos biocombustíveis mais amplamente utilizados. Produzido principalmente a partir da fermentação de açúcares presentes em matérias-primas vegetais, como a cana-de-açúcar e o milho, o etanol é uma opção promissora para uma matriz energética mais sustentável e economicamente viável. Os Estados Unidos e o Brasil são os maiores produtores mundiais de etanol, respondendo juntos por cerca de 80% da produção global. Em 2023, os EUA produziram aproximadamente 58 bilhões de litros de etanol, enquanto o Brasil produziu cerca de 35,5 bilhões de litros no mesmo ano (UDOP, 2024; Portal do Agronegócio, 2024).

Nos últimos anos, a produção de etanol a partir do milho tem sido uma tendência crescente, especialmente no Brasil. Na safra 2023/2024, a produção de etanol de milho alcançou 6 bilhões de litros, representando um aumento de 36% em relação ao ciclo anterior (CNA Brasil, 2024). Com isso, esse processo não apenas gera etanol, mas também coprodutos valiosos, como os grãos secos de destilaria com solúveis (GSDS), que é amplamente utilizado como aditivo para ração animal devido ao seu alto valor proteico e o óleo de milho de destilaria (OMD) que possui potencial para aplicações em mercados como a produção de biocombustíveis, incluindo o biodiesel (CNA Brasil, 2024).

O biodiesel é um biocombustível biodegradável que apresenta propriedades físico-químicas semelhantes às do diesel convencional, porém com vantagens ambientais, como menor emissão de poluentes atmosféricos (PRIO, 2024), sua produção ocorre principalmente por meio da transesterificação de óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois de cadeia curta, como metanol ou etanol, na presença de catalisadores (UFSCar, 2024). No entanto, o uso de catalisadores homogêneos apresenta desvantagens, como a dificuldade na separação e purificação dos produtos finais, além da geração de efluentes que requerem tratamento adequado. Uma alternativa promissora é a utilização de catalisadores heterogêneos, que oferecem vantagens como facilidade de separação do

produto final, menor corrosividade e possibilidade de reutilização, contribuindo para a sustentabilidade do processo (IFRN, 2024). Dentre esses catalisadores, as lipases imobilizadas se destacam por sua alta seletividade e eficiência em condições de reação mais brandas. Além disso, as lipases podem ser reutilizadas, o que agrega valor ao processo produtivo, reduzindo custos e minimizando a geração de resíduos (FAPESP, 2024). Essa abordagem pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de uma matriz energética mais sustentável e economicamente viável.

A integração dos processos de produção de etanol e biodiesel a partir dos coprodutos do milho, como o OMD e o GSDS, oferece uma oportunidade única para agregar valor e aumentar a eficiência das biorrefinarias. Ao utilizar o OMD como matéria-prima na produção de biodiesel e o GSDS como meio de cultivo para a produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES), é possível criar uma cadeia de valor mais integrada e sustentável.

Essa abordagem não apenas possibilita a redução de custos na produção de biodiesel, mas também reforça a viabilidade econômica e ambiental desse processo. Além disso, a integração dos processos de produção de etanol e biodiesel pode contribuir para a diversificação da matriz energética, agregar valor aos coprodutos agroindustriais e promover o desenvolvimento sustentável.

Nesse contexto, este estudo tem como objetivo analisar a produção de biodiesel a partir dos coprodutos do milho, visando a integração de processos de produção de etanol e biodiesel e destacando as oportunidades e desafios associados a essa abordagem. Além disso, será investigado como essa integração pode otimizar o aproveitamento de matérias-primas, reduzir desperdícios e fortalecer a viabilidade econômica e ambiental da produção de biocombustíveis. Essa pesquisa visa contribuir para o avanço do conhecimento sobre a produção de biocombustíveis e promover a adoção de práticas mais sustentáveis e eficientes na indústria.

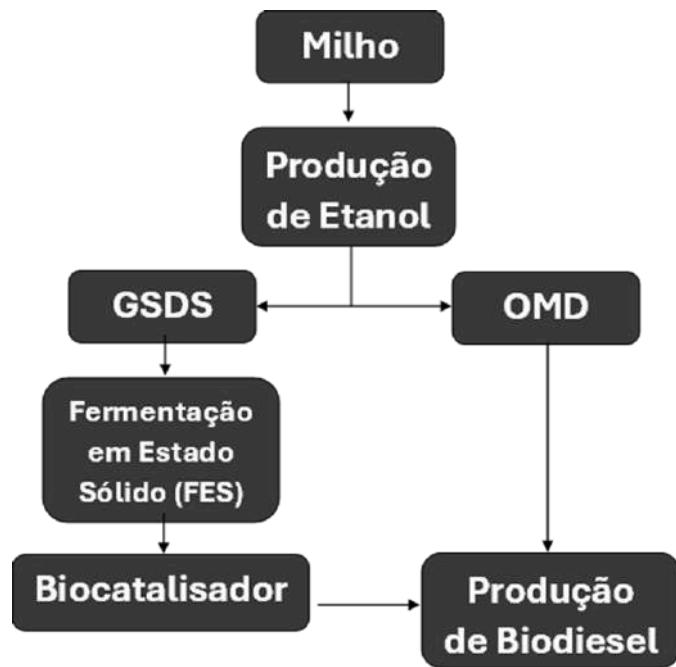


Figura 1: Fluxograma da integração dos processos de produção de etanol e biodiesel.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Etanol

Também conhecido como álcool etílico, o etanol é um biocombustível renovável amplamente produzido por meio da fermentação de açúcares por microrganismos, geralmente leveduras. A reação química básica para a produção de etanol a partir da glicose, principal açúcar fermentável, pode ser representada pela equação da Figura 1:

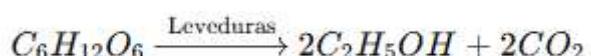


Figura 2: Representação da reação química básica para a produção de etanol a partir da glicose.

De acordo com estudos recentes , o etanol é conceituado como um biocombustível líquido renovável, obtido mediante a fermentação de biomassa vegetal, como cana-de-açúcar e milho. Essa substância apresenta-se como uma alternativa promissora para substituir parcial ou totalmente a gasolina em motores de combustão interna, contribuindo para a redução das emissões de gases de efeito estufa e para a mitigação das mudanças climáticas (Kumar et al., 2019).

Contendo uma grande concentração de produção nos Estados Unidos, o maior produtor de etanol no mundo, o etanol segue sendo mais rentável ao país, já que ele dependia significativamente das importações de petróleo, com mais de 62% do petróleo sendo importado nos anos 90. Com isso, o etanol passa a ser uma alternativa renovável que pode contribuir para a redução da dependência energética dos Estados Unidos em relação às importações de petróleo, a partir de sua retirada do milho. Ao aumentar a produção e o consumo de etanol, há consequentemente uma redução em sua vulnerabilidade às flutuações do mercado internacional de petróleo e um aumento de sua segurança energética (Bothast; Schileicher, 2004).

O Brasil tem uma atuação muito proeminente em sua produção de cana-de-açúcar, sendo o segundo maior produtor de etanol do mundo. Desde 1920 o país vem aprimorando suas técnicas, e o etanol há décadas desempenha um papel importantíssimo na matriz energética nacional destacando-se como uma fonte renovável e sustentável de energia (BNDES Setorial, 2007). De acordo com estudos realizados pela União da Indústria de Cana-de-Açúcar (ÚNICA, 2020), a utilização do etanol no Brasil, desde o lançamento dos veículos flex até o início de 2019, resultou na redução de 535 milhões de toneladas de CO₂ equivalente na atmosfera, contribuindo significativamente para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa.

A União Europeia (UE) tem implementado políticas para promover a produção e uso de biocombustíveis, incluindo o etanol, como parte de sua estratégia para reduzir as emissões de gases de efeito estufa (GEE) e mitigar as mudanças climáticas (Comissão Europeia, 2020). No entanto, a produção de etanol na UE é relativamente limitada em comparação com outros países, como o Brasil, que é um dos principais produtores mundiais de etanol (OECD/FAO, 2020). Em análises realizadas foram demonstrados que o balanço energético da produção de etanol é favorável, uma vez que a energia líquida produzida por um galão de etanol excede a energia fóssil utilizada em sua produção (Shapouri et al. 1996; Wang et al. 1997).

Os dois maiores produtores de etanol são Brasil e Estados Unidos. No Brasil a produção majoritariamente é feita a partir da cana-de açúcar e do milho, enquanto os Estados Unidos utilizam apenas o milho (Bothast, Schlicher, 2004).

2.2. Etanol de milho no Brasil

De acordo com a CONAB (2024), a produção de etanol no Brasil alcançou um patamar recorde em 2024, com uma oferta total de 36,83 bilhões de litros, sendo que o etanol de milho apresentou um crescimento de 32,8% e alcançou 7,7 bilhões de litros. Embora o Brasil possua papel de destaque na produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, estudos recentes têm explorado alternativas inovadoras para a produção de etanol, incluindo a utilização de novas matérias-primas, como bagaço de cana-de-açúcar, milho e mandioca, além da implementação de processos tecnológicos avançados, como a alcoolquímica. Essas iniciativas visam diversificar as fontes de produção de etanol e otimizar os processos produtivos, contribuindo para a consolidação do Brasil como líder no setor de biocombustíveis, segundo a Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) em 2021.

A produção de etanol de milho no Brasil configura-se como uma fonte relevante de energia renovável, contribuindo significativamente para a mitigação das emissões de gases de efeito estufa e a melhoria da qualidade do ar, conforme destacado por Seabra et al. (2020). Além disso, a rentabilidade da produção de etanol de milho tem sido substancial, especialmente em regiões como o Centro-Oeste, onde a estrutura de custo competitiva e a expansão da área cultivada têm favorecido a produção, como observado por Silva et al. (2019).

Observa-se um crescimento significativo na utilização de milho para a produção de etanol no Brasil, especialmente na região Centro-Oeste, nas últimas safras. Esse aumento é atribuído à viabilidade econômica e à disponibilidade de matéria-prima na região, o que tem impulsionado a expansão da indústria de etanol de milho no país. Entre as safras 2018/19 e 2019/20, o volume de produção de etanol de milho mais que dobrou chegando a quase 5%

da produção nacional do biocombustível, e a tendência é de que continue em expansão, inclusive com a instalação de novas unidades de produção (CONAB, 2020a). É essencial reconhecer que a produção de etanol de milho também enfrenta desafios significativos, incluindo a concorrência com a produção de etanol de cana-de-açúcar e a necessidade de investimentos em infraestrutura e tecnologia, conforme observado por Martins et al. (2020). Essa compreensão é fundamental para desenvolver estratégias sustentáveis e eficazes para o setor.

2.2.1. Coprodutos da produção de etanol de milho

2.2.1.1. Grãos Secos de Destilaria com Solúveis (GSDS)

Os Grãos Secos de Destilaria com Solúveis (GSDS) representam um coproducto valioso da produção de etanol a partir de milho, obtido após a fermentação e a destilação para a produção do etanol do milho (Kim et al., 2018). Segundo Buenavista et al. (2021), o GSDS pode ser aproveitado como matéria-prima para a produção de biodiesel, a partir da extração do óleo. Sua caracterização revelou propriedades físicas que o tornam uma fonte renovável e sustentável para a fabricação de biocompósitos, destacando-se pela resistência à umidade e boas propriedades térmicas. Esse uso contribui para reduzir a dependência de recursos não renováveis e minimizar o impacto ambiental ao valorizar resíduos gerados na produção de etanol (Zarrinbakhsh et al., 2013; Mohanty et al., 2000). Essa abordagem sustentável para a produção de biodiesel de milho não apenas contribui para a redução das emissões de gases de efeito estufa, mas também promove a utilização eficiente de recursos e a minimização de resíduos.

Composicionalmente, o GSDS é uma mistura complexa de grãos de milho não fermentados, proteínas, gorduras, minerais e vitaminas, conforme destacado por Liu et al. (2019). Devido ao seu alto teor de proteínas e energia, ele pode ser utilizado como alimento para animais, especialmente para aves e suínos, tornando-se uma fonte importante de nutrição para a indústria pecuária (Wang et al., 2020). Essa aplicação do GSDS não apenas reduz os custos de produção de alimentos para animais, mas também contribui para a redução de resíduos na produção de etanol.

Além disso, sob outra perspectiva, o GSDS pode ser valorizado por meio de sua aplicação em bioprocessos, como na produção de enzimas por fermentação em estado sólido. Seu alto teor de matéria orgânica e nutrientes essenciais favorece o crescimento de microrganismos específicos, tornando-o um substrato promissor para a biotecnologia industrial e a produção sustentável de biocatalisadores.

2.2.1.2. Óleo de Milho de Destilaria (OMD)

O OMD é um segundo coproduto da produção de etanol a partir do milho, obtido após a fermentação e destilação do grão. Diferente do óleo de milho refinado comercializado para consumo humano, o OMD possui uma composição distinta, sendo mais rico em ácidos graxos livres (AGLs) e impurezas que impactam sua qualidade e estabilidade (Kumar et al., 2020; Li et al., 2019).

Composicionalmente, o OMD contém uma alta concentração de ácidos graxos insaturados, incluindo ômega-6 e ômega-3, que possuem propriedades benéficas para a saúde, mas também uma elevada acidez, o que pode dificultar seu uso direto em processos de transesterificação catalisados por bases (Chen et al., 2019; Zhang et al., 2020). Estão presentes em sua composição os seguintes ácidos graxos: linoleico (18:2), oleico (18:1), palmítico (16:0), linolênico (18:3n3), esteárico (18:0), araquídico (20:0) e cis ou z-11-eicosanoico (20:1n9). A elevada acidez do OMD, como a encontrada por Aguiéiras et al. igual a $13,1 \pm 1,96$ (% em massa), pode levar à formação de sabões indesejáveis durante a reação, reduzindo a eficiência na conversão para biodiesel.

Além disso, a recuperação do OMD ainda representa um desafio, pois cerca de 50% do óleo de milho disponível não é recuperado durante o processo de produção de etanol. Essa perda é atribuída à complexidade das operações envolvidas, como fermentação, destilação e secagem. Para aumentar a eficiência de recuperação, diversas técnicas têm sido estudadas, incluindo o uso de enzimas, como proteases, que podem elevar a extração do óleo em até 10% (Novozymes, 2020).

A redução da acidez do OMD é um fator crucial para ampliar suas aplicações, especialmente para permitir a utilização de catalisadores básicos na produção de biodiesel. Estratégias como o pré-tratamento por neutralização química ou a remoção seletiva de ácidos graxos livres podem melhorar sua qualidade, tornando-o mais adequado para processos industriais (Kumar et al., 2020). Além disso, a otimização do processo de branqueamento pode contribuir para a remoção de impurezas e a melhoria da estabilidade do óleo, tornando-o comparável a óleos de grau industrial e expandindo suas aplicações além da produção de biocombustíveis (Kumar et al., 2020).

2.3. Biodiesel

Devido à atual dependência global do petróleo e do diesel de petróleo, ou combustíveis fósseis, que têm sido amplamente utilizados como fontes de energia

primárias, um renovado interesse e uma crescente conscientização sobre fontes de energia alternativas, como biodiesel, hidrogênio e bioetanol, para uso em motores diesel tem sido observado (Akoh et al., 2007).

O biodiesel, um combustível renovável e sustentável, é formalmente definido pela ASTM International como um composto orgânico resultante da esterificação de ácidos graxos de cadeia longa, que cumprem rigorosamente os parâmetros estabelecidos pela norma ASTM D6751 (ASTM, 2008a). Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o biodiesel é composto por uma mistura de ésteres de ácidos graxos, que são derivados de óleos vegetais ou animais (ANP, 2023).

Seguindo dessa maneira, a composição química do biodiesel é caracterizada pela presença de uma mistura de ésteres de ácidos graxos, incluindo ésteres de ácido oleico (C18:1), ésteres de ácido linoleico (C18:2), ésteres de ácido palmitico (C16:0) e ésteres de ácido esteárico (C18:0), conforme estabelecido pela norma ASTM D6751-19 (ASTM, 2019). Adicionalmente, o biodiesel pode conter outros componentes, tais como glicerol, água e impurezas, que são considerados na norma EN 14214:2019 (EN, 2019).

Fatores ambientais, tais como a temperatura, a pressão e a umidade, durante o armazenamento e o transporte podem exercer uma influência significativa sobre a composição do biodiesel (Canakci; Van Gerpen, 2001). Com isso, características físico-químicas do biodiesel são influenciadas pela sua composição e por fatores ambientais. Em geral, o biodiesel apresenta um ponto de fusão entre -10°C e 10°C, um ponto de ebulição entre 150°C e 400°C, uma densidade entre 0,88 e 0,90 g/cm³, uma viscosidade entre 3,5 e 5,0 mm²/s, um índice de cetano entre 45 e 65, um conteúdo de enxofre muito baixo, geralmente inferior a 0,001%, e um conteúdo de água geralmente inferior a 0,05% (Ma e Hanna, 1999). A estabilidade oxidativa do biodiesel é influenciada pela sua composição e pela presença de antioxidantes.

Isso destaca a importância de considerar cuidadosamente todos os aspectos da produção e do manuseio do biodiesel para garantir sua qualidade e desempenho no desenvolvimento e na utilização desse combustível alternativo (Akoh et al., 2007).

2.3.1. Consumo e produção

No Brasil, o governo federal instituiu, em 2004, o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), com o objetivo de incorporar o biodiesel à matriz energética nacional de forma sustentável e inclusiva (Brasil, 2004). As diretrizes principais do programa incluem a promoção de um modelo de produção que respeite o meio ambiente e os direitos sociais, garantindo preços competitivos e qualidade do produto, além de fomentar a diversificação de culturas oleaginosas e fortalecer a agricultura familiar. Além disso, o programa oferece benefícios fiscais e subsídios para os produtores, visando incentivar a

produção de biodiesel de forma sustentável e socialmente responsável. A Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, estabeleceu a obrigatoriedade da adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no Brasil, com um percentual mínimo de 5% em volume (BRASIL, 2005). Essa medida visou reduzir a dependência do país dos combustíveis fósseis e promover a sustentabilidade energética. Posteriormente, a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, alterou esse percentual para um mínimo de 11% e máximo de 15% de biodiesel no diesel rodoviário (BRASIL, 2014). Essa mudança refletiu a evolução da política energética do país e a necessidade de aumentar a participação do biodiesel na matriz energética. Por fim, a Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016, modificou a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, ao estabelecer um cronograma progressivo para a elevação dos percentuais obrigatórios de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional (BRASIL, 2016). Em março de 2024, o percentual da mistura foi definido em 14% (Resolução CNPE nº 8/2023), com previsão de atingir 15% em março de 2025 (BRASIL, 2023). Essa alteração legislativa trouxe maior clareza e previsibilidade para o setor, reafirmando o compromisso do governo com a sustentabilidade energética e a redução da dependência de combustíveis fósseis.

Padrões de biodiesel foram estabelecidos em vários países com o objetivo de garantir que apenas biodiesel de alta qualidade chegue ao mercado. Esses padrões são fundamentais para assegurar a qualidade e a segurança do combustível, além de promover a confiança dos consumidores e a sustentabilidade do setor (Moser, 2010). Nesse contexto, a ANP desempenha um papel fundamental na regulação da produção, importação e comercialização de biodiesel no Brasil. Além disso, a agência regulamentou a adição de biodiesel ao óleo diesel, estabelecendo regras para a comercialização de biodiesel para atendimento da adição obrigatória (ANP, 2009). Essa regulamentação foi fundamental para garantir a qualidade e a segurança do biodiesel comercializado no país, visando garantir a qualidade do produto e proteger os consumidores. Ela estabelece rigorosas especificações de qualidade para o biodiesel, conforme disposto na Resolução ANP nº 920, de 4 de abril de 2023. Essas especificações incluem parâmetros como teor de água, índice de acidez e estabilidade à oxidação, que são fundamentais para garantir a qualidade e a segurança do biodiesel exigindo que os produtores e importadores de biodiesel mantenham um sistema de controle de qualidade, que inclui a realização de análises laboratoriais e a emissão de certificados de qualidade (ANP, 2023).

A produção de biodiesel no Brasil está intimamente relacionada à produção de grãos, especialmente soja, que é um dos principais insumos utilizados. De acordo com a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), a produção de grãos no Brasil deve alcançar 322,3 milhões de toneladas na safra 2024/25, o que representa um aumento significativo em relação às safras anteriores (CONAB, 2023). É fundamental considerar que

a produção de biodiesel não é exclusivamente dependente da produção de grãos, mas também está influenciada por outros fatores cruciais, como a demanda por combustíveis renováveis e a política energética nacional, que desempenham um papel vital na definição dos rumos da produção de biodiesel no país, conforme estabelecido pela Resolução 16/2018 do Conselho Nacional de Política Energética (CNPE), que traça diretrizes para a política energética nacional, incluindo a meta ambiciosa de produzir 10,2 bilhões de litros de biodiesel em 2025 (BRASIL, 2018). De acordo com o relatório "Estatísticas 2023 - Biodiesel", publicado pela ANP, a produção de biodiesel no Brasil apresentou um crescimento significativo de 269,82% entre os anos de 2008 e 2017. Além disso, o relatório destaca que o estado do Rio Grande do Sul é o principal produtor de biodiesel no país, com a soja sendo a matéria-prima mais utilizada nesse processo.

Nesse contexto, a soja desempenha um papel fundamental como matéria-prima para a produção de biodiesel, conforme destacado pela Associação Brasileira das Indústrias de Óleos Vegetais (Abiove), que registrou uma média de uso de óleo de soja para biodiesel de 2,54 milhões de toneladas em 2016, correspondendo a 32,6% da produção total de óleo de soja na safra 2015/16, conforme relatório da Abiove (ABIOVE, 2017).

2.3.2. Matéria-prima e processos de produção

A seleção da matéria-prima e do processo de produção desempenham um papel crucial na determinação da composição química do biodiesel, pois afeta a qualidade e a quantidade do produto final (Canakci e Van Gerpen, 2001). A principal rota de produção de biodiesel utiliza óleos vegetais e gorduras animais como matérias-primas em reações de transesterificação. A transesterificação é uma reação química que envolve a substituição do grupo alquílico de um éster por um grupo alquílico de um álcool (Fukuda et al., 2001).

Pode ser visto sua representação na Figura 2:

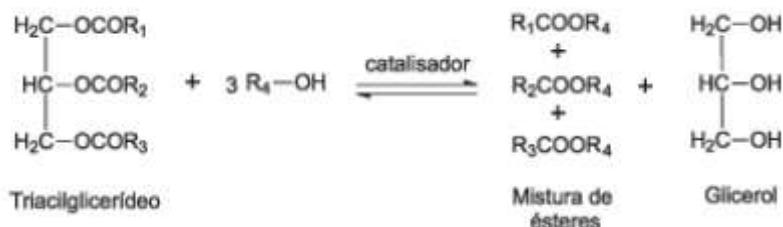


Figura 3: Figura do esquema de reação de transesterificação.

Fonte: Geris et al., 2007

Já a esterificação é uma reação química que envolve a conversão de ácidos graxos em ésteres e água, utilizando um álcool e um catalisador (Freedman et al., 1986; Ma e Hanna, 1999). Essa reação é importante para a produção de biodiesel, pois permite a conversão de ácidos graxos em ésteres (Figura 3).

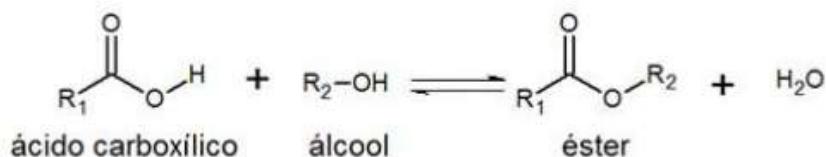


Figura 4: Figura do esquema de reação de esterificação

No Brasil, a produção acontece principalmente a partir do óleo de soja, que apresenta uma disponibilidade consistente ao longo do ano, graças à existência de uma cadeia produtora e distribuidora bem estabelecida no país, como pode ser observado na Tabela 1 (Alves et al., 2017; ANP, 2024). Essa característica é fundamental para garantir a segurança e a estabilidade do fornecimento de biodiesel, permitindo que o Brasil se mantenha como um dos principais produtores de biodiesel do mundo.

Além do óleo de soja, os óleos vegetais de colza, de girassol e de palma também podem ser utilizados, enquanto as gorduras animais incluem a gordura de boi e a gordura de porco (Fukuda et al., 2001). Os óleos vegetais são ricos em ácidos graxos, incluindo palmítico (hexadecanóico), esteárico (octadecanóico), oleico (9(Z)-octadecenóico), linoleico (9(Z),12(Z)-octadecadienóico) e linolênico (9(Z),12(Z),15(Z)-octadecatrienóico) (Knothe; Razon, 2017).

Fontes alternativas aos óleos vegetais refinados, incluindo o uso de matérias-primas residuais como o OMD representam uma oportunidade de desenvolvimento econômico e tecnológico no setor de biocombustíveis.

| Matérias-primas | Matérias-primas utilizadas na produção de biodiesel (B100) (m³) | | | | | | | | | | 2022 % |
|------------------------------------|---|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | 2014 | 2015 | 2016 | 2017 | 2018 | 2019 | 2020 | 2021 | 2022 | 2023 | |
| Total | 3.324.009 | 3.767.987 | 3.625.224 | 4.221.271 | 5.346.755 | 6.035.806 | 6.542.333 | 6.806.324 | 6.425.131 | 7.546.133 | 17,45 |
| Óleo de soja | 2.573.331 | 2.960.687 | 2.828.765 | 2.964.246 | 3.743.316 | 4.087.804 | 4.677.523 | 4.907.873 | 4.225.399 | 5.217.994 | 23,49 |
| Outros óleos vegetais ¹ | 72.196 | 76.411 | 60.753 | 54.371 | 128.858 | 350.193 | 297.144 | 280.711 | 231.471 | 330.407 | 42,74 |
| Gordura animal ² | 640.454 | 687.992 | 620.181 | 715.273 | 862.505 | 831.632 | 737.834 | 714.242 | 778.170 | 638.788 | -17,91 |
| Outros ³ | 38.028 | 42.898 | 115.525 | 487.381 | 612.076 | 766.178 | 829.832 | 903.499 | 1.190.091 | 1.358.945 | 14,19 |

Tabela 1: Matérias - primas utilizadas na produção de biodiesel (B100).

Fonte: ANP. Anuário Estatístico Brasileiro do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis 2024.

A respeito dos álcoois usados, embora o etanol seja ambientalmente vantajoso em contextos como o brasileiro, seu uso enfrenta a concorrência do metanol, amplamente utilizado como reagente na transesterificação (Freedman et al., 1986). O etanol, produzido principalmente a partir da cana-de-açúcar no Brasil, é um recurso renovável e sustentável que reduz ainda mais as emissões de gases de efeito estufa quando comparado ao metanol de origem fóssil (OECD/FAO, 2020). Além disso, a integração da produção de biodiesel e etanol de milho em biorrefinarias é uma vantagem competitiva no contexto brasileiro, otimizando o uso de recursos e reduzindo custos operacionais (EMBRAPA, 2014).

Entretanto, o metanol apresenta vantagens econômicas significativas devido ao seu menor custo e maior disponibilidade no mercado internacional (ASTM INTERNATIONAL, 2008). Ele também possui maior reatividade na transesterificação, exigindo menores quantidades para alcançar rendimentos elevados (Ma; Hanna, 1999). Contudo, o metanol é derivado de fontes fósseis, o que limita seu apelo em estratégias voltadas para a sustentabilidade. A escolha entre etanol e metanol depende, portanto, de fatores econômicos, ambientais e técnicos, além de estar intimamente ligada à disponibilidade regional de cada recurso.

No Brasil, a preferência pelo etanol reflete não apenas a abundância de matéria-prima, mas também os benefícios ambientais associados ao seu uso, alinhando-se aos compromissos do país com a redução de emissões e a diversificação energética (Ministério de Minas e Energia, 2024).

2.4. Biodiesel de Milho

O biodiesel de milho é um biocombustível que tem ganhado atenção nos últimos anos devido ao seu potencial como fonte de energia renovável e sustentável. De acordo com Veljković et al. (2018), o biodiesel de milho é composto por ésteres alquilaicos de ácidos graxos, que são derivados do óleo de milho. Esse óleo é rico em ácidos graxos essenciais, como o ácido linoleico, o ácido oleico e o ácido palmítico, que desempenham um papel fundamental na formação dos ésteres alquilaicos, os principais componentes do biodiesel (Veljković et al., 2018).

A produção de biodiesel de milho envolve diferentes etapas, sendo a extração do óleo uma das mais importantes. O óleo de milho pode ser extraído diretamente do gérmen de milho ou obtido na forma do OMD, conforme descrito previamente. A extração do OMD é particularmente vantajosa do ponto de vista econômico e ambiental, pois aproveita um coproducto da produção de etanol, reduzindo custos e promovendo a sustentabilidade do processo (Aguieiras et al., 2024). Após a extração, o óleo de milho passa pela reação de

transesterificação, onde os triglicerídeos presentes no óleo são convertidos em ésteres alquílicos por meio da reação com um álcool, como metanol ou etanol, na presença de um catalisador.

Portanto, o biodiesel de óleo de milho de destilaria representa uma alternativa promissora na busca por combustíveis renováveis e sustentáveis, especialmente quando associado ao uso de tecnologias inovadoras e estratégias integradas de produção em biorrefinarias. A integração de processos, o aproveitamento de coprodutos e a constante evolução das tecnologias de conversão são fatores fundamentais para consolidar o biodiesel de milho como uma solução viável e competitiva no mercado energético.

2.4.1. Catalisadores

Os catalisadores desempenham um papel fundamental na produção de biodiesel, pois eles têm a capacidade de influenciar a taxa de reação, a seletividade e a estabilidade do produto (Ma e Hanna, 1999; Wan Nur Aisyah Wan Osmana et al., 2024). Essa importância se deve ao fato de que os catalisadores são substâncias que aceleram a velocidade de uma reação química sem serem consumidos ou alterados durante o processo (Kresge et al., 1992). Além disso, os catalisadores têm a capacidade de reduzir a energia de ativação necessária para que a reação ocorra, permitindo que a reação seja realizada em condições mais brandas (Kresge et al., 1992).

Segundo Wan Nur Aisyah Wan Osmana et al. (2024), existem vários tipos de catalisadores que podem ser utilizados na produção de biodiesel e a escolha do tipo de catalisador depende das condições específicas da reação e do tipo de biodiesel que se deseja produzir. Portanto, é fundamental considerar as características e vantagens de cada tipo de catalisador para otimizar a produção de biodiesel.

A transesterificação química envolve o uso de catalisadores ácidos ou alcalinos, e a transesterificação enzimática utiliza enzimas como catalisadores. Embora ambos os métodos sejam eficazes, a transesterificação enzimática é considerada uma alternativa mais sustentável e ambientalmente compatível, pois as enzimas são catalisadores naturais que operam em condições mais brandas e geram menos resíduos químicos (Mathew et al., 2021).

O catalisador básico, é capaz de reduzir a energia de ativação necessária para a reação e melhorar a seletividade do produto (Akoh et al., 2007). Segundo Vicente et al. (2004) e Freedman et al. (1986), os catalisadores básicos mais utilizados são os hidróxidos e alcóxidos de sódio ou de potássio. Mas a utilização de catalisadores básicos apresenta uma limitação quando o óleo contém altos teores de ácidos graxos livres (AGL), podendo

levar à formação de sabões e reduzir o rendimento da reação (Kumar et al., 2018). Nesses casos, a utilização de catalisadores ácidos ou biocatalisadores enzimáticos pode ser uma alternativa mais eficaz.

O catalisador ácido é capaz de acelerar a reação de transesterificação e melhorar a eficiência do processo (Ma e Hanna, 1999). Com isso, na catálise ácida, os ácidos de Brönsted são os mais utilizados, incluindo o ácido clorídrico, sulfúrico (anidros) e sulfônicos (Kildiran et al., 1996; Siler-Marinkovic e Tomasevic, 1998). Esse método é particularmente útil quando o óleo utilizado como matéria-prima possui alto teor de ácidos graxos livres e água. Além disso, o ácido sulfúrico é frequentemente empregado devido à sua capacidade de fornecer uma taxa de reação mais rápida e uma maior seletividade para o produto desejado (Ma e Hanna, 1999).

No entanto, o uso de catalisadores ácidos apresenta algumas desvantagens. O principal desafio é a sua corrosividade, que pode causar danos significativos aos equipamentos de processamento, aumentando os custos de manutenção e exigindo materiais resistentes à corrosão (Ma e Hanna, 1999). Além disso, a remoção do catalisador e a purificação do biodiesel tornam-se mais complexas e dispendiosas, devido à necessidade de neutralização e posterior separação dos subprodutos ácidos (Kildiran et al., 1996).

Os catalisadores enzimáticos são uma opção promissora para a produção de biodiesel, pois eles podem oferecer uma maior seletividade e eficiência em comparação com os catalisadores químicos tradicionais, como destaca Moser (2010) e Liu et al. (2019) e podem catalisar tanto reações de transesterificação quanto de esterificação, permitindo o uso de óleos residuais com elevados teores de AGL, tais como OMD e ácidos graxos livres (Akoh et al., 2007). Além disso, biocatalisadores produzem glicerol de alta pureza e demandam menos etapas de purificação, reduzindo os custos de produção e os impactos ambientais (Ferrari et al., 2005).

No entanto, esses catalisadores também apresentam algumas limitações, incluindo um alto custo, baixa estabilidade e sensibilidade às condições de reação. Diante disso, para superar essas limitações, é fundamental desenvolver novas tecnologias e estratégias para a produção de catalisadores enzimáticos, como a utilização de fontes de enzimas com maior estabilidade e a otimização das condições de reação (Liu et al., 2019). Isso pode ajudar a tornar a produção enzimática de biodiesel mais eficiente, sustentável e rentável.

2.4.2. Lipases

A hidrólise de triglicerídeos é um processo bioquímico fundamental que é catalisado pelas lipases (triacylglycerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3), enzimas que desempenham um papel crucial na liberação de ácidos graxos e glicerol (Sharma et al., 2020; Kumar et al., 2016). Essas enzimas são classificadas em diferentes tipos, incluindo lipases ácidas, alcalinas e neutras, cada uma com propriedades e aplicações específicas que são determinadas por sua estrutura molecular e mecanismo de ação (Lee et al., 2018). As lipases se destacam por sua alta seletividade e eficiência em condições de reação mais brandas. Além disso, as lipases, quando imobilizadas, podem ser reutilizadas, o que agrega valor ao processo produtivo, reduzindo custos e minimizando a geração de resíduos. Os avanços na tecnologia de produção de lipases têm permitido a produção de biodiesel de forma eficiente e sustentável (Santos et al., 2020). Além disso, as lipases também têm aplicações na indústria alimentícia, na medicina e em outras áreas, destacando sua versatilidade e importância para a sociedade.

No entanto, a produção de biodiesel com lipases também apresenta alguns desafios, incluindo a estabilidade das mesmas durante o processo e seu elevado custo (Sharma et al., 2020). Além disso, o processo de produção de biodiesel com lipases pode ser difícil de escalar para grandes quantidades (Kumar et al., 2016). Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias que promovam melhora da atividade e estabilidade dessas enzimas, além da redução dos custos de produção.

2.4.2.1. Produção de lipases por fermentação em estado sólido

A produção de lipases por fermentação em estado sólido (FES) é amplamente reconhecida como uma técnica promissora para a obtenção de enzimas de alta qualidade (Singhania et al., 2017; Kumar et al., 2018). Esse processo envolve o cultivo de microrganismos em meios sólidos, o que proporciona um ambiente semelhante ao natural de muitos fungos e bactérias produtoras de enzimas. Além de ser uma tecnologia eficaz, a FES destaca-se por sua sustentabilidade, especialmente quando coprodutos agrícolas, como farelos, tortas oleaginosas e cascas de frutas, são utilizados como meio de cultivo (Aguieiras et al., 2024; Patel et al., 2020).

A FES apresenta diversas vantagens sobre a fermentação submersa, como maior concentração de enzimas, menor consumo de água e energia, além de uma produção mais econômica quando comparada a métodos convencionais (Pandey et al., 2019). Isso se deve à simplicidade do processo e à possibilidade de utilizar resíduos agroindustriais como fonte

de carbono e nutrientes essenciais, reduzindo os custos de produção e promovendo o reaproveitamento de subprodutos agrícolas.

A aplicação de lipases obtidas por FES é vasta, incluindo a produção de biodiesel, modificação de gorduras e óleos, síntese de compostos aromáticos e tratamento de resíduos industriais. A produção dessas enzimas por FES permite não apenas reduzir o custo do processo, mas também aumentar a sustentabilidade das operações industriais, promovendo uma economia circular (Patel et al., 2020).

A seleção do microrganismo adequado é crucial para o sucesso da produção de lipases por FES. Fungos filamentosos, como *Rhizomucor miehei* e *Aspergillus niger*, são frequentemente utilizados devido à sua capacidade de produzir grandes quantidades de enzimas extracelulares em condições de baixa disponibilidade de água (Kumar et al., 2018; Cavalcanti et al., 2005). O tipo de substrato e as condições de fermentação, como temperatura, umidade e tempo de incubação, também influenciam diretamente a produtividade e a atividade da enzima produzida. A fermentação pode ser conduzida em diferentes tipos de biorreatores, como bandejas e sistemas de coluna, cada um apresentando vantagens específicas para a otimização da produção (Pandey et al., 2019).

Dentre os coprodutos utilizados na produção de lipases por FES, estudos demonstram que o GSDS oriundo da produção de etanol de milho é um substrato adequado para o fornecimento uma matriz estrutural ideal para o crescimento microbiano, mas também é rico em proteínas e fibras, o que contribui para a produção de lipases com elevada atividade catalítica (Aguieiras et al., 2024).

Nesse caso, a utilização direta do material fermentado sólido e seco como biocatalisador, na forma de preparado enzimático sólido (PES) com atividade lipásica apresenta vantagens no que diz respeito ao fato da lipase encontrar-se aderida ao material sólido fermentado, sem a necessidade de sua extração e imobilização.

Portanto, a fermentação em estado sólido utilizando substratos de baixo custo e microrganismos selecionados representa uma estratégia eficiente para a produção de lipases em escala industrial, destacando-se como uma alternativa sustentável e competitiva para processos enzimáticos de alta demanda.

3. Materiais

Óleo de milho de destilaria (OMD) e os grãos secos de destilaria com solúveis (GSDS) foram obtidos de uma planta industrial brasileira localizada no Mato Grosso do Sul. O OMD apresentou acidez de $13,1 \pm 1,96\%$ em massa e a seguinte composição de ácidos graxos (% em massa): $46,2 \pm 1,3$ de ácido linoleico (18:2), $30,7 \pm 0,5$ de ácido oleico (18:1), $12,6 \pm 0,5$ de ácido palmítico (16:0), $7,2 \pm 2,4$ de ácido linolênico (18:3n3), $2 \pm 0,1$ de ácido esteárico (18:0), 0,9 de ácido araquídico (20:0) e 0,5 de ácido cis ou z-11-eicosanoico (20:1n9), conforme descrito por Aguiéiras et al. (2022).

O biocatalisador comercial utilizado foi Novozym 435, constituído por lipase B de *Candida antarctica* immobilizada em resina acrílica macroporosa, com atividade de esterificação de $4135,4 \pm 386,3$ U/g. Esta enzima foi produzida e fornecida pela Novozymes LTDA. Etanol anidro, etanol hidratado (95%), hexano e ácido oleico extra puro P.A. foram fornecidos pela LabSynth (São Paulo, Brasil).

O preparado enzimático sólido (PES) utilizado foi obtido por fermentação em estado sólido em reatores do tipo bandeja. A amostra utilizada foi de fermentação conduzida a temperaturas de 30, 35 e 40°C, utilizando GSDS como fonte principal de nutrientes. O substrato foi inoculado com *Rhizomucor miehei* (registro de acesso A7A68AD no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado [SisGen], Brasil) e a fermentação foi conduzida como descrito em Aguiéiras et al., 2024. Após a fermentação, as amostras foram liofilizadas e armazenadas a 4 °C até o momento de uso. Este PES foi utilizado diretamente como catalisador em reações subsequentes de síntese de biodiesel.

4. Metodologia

4.1. Reações de esterificação e transesterificação

As reações de esterificação foram realizadas para investigar a eficiência sintética do biocatalisador, utilizando ácido oleico e etanol como reagentes, seguindo procedimentos previamente descritos (Aguieiras et al., 2014). Além disso, o PES foi aplicado no processo de etanólise do OMD. Os ensaios foram conduzidos em duplicita, utilizando reatores de vidro em batelada hermeticamente fechados com capacidades de 15 mL ou 30 mL, equipados com agitação magnética e controle termostático. O sistema reacional não continha solventes, sendo composto exclusivamente pelos substratos (ácido oleico ou OMD e etanol) e pelos biocatalisadores.

Nas reações de esterificação, foi utilizada uma razão molar de 1:1 entre etanol hidratado e ácido oleico, com 20% em massa de PES obtido de FES no GSDS como biocatalisador, conduzindo o processo a 45 °C. Para a etanólise do OMD, foram utilizados 20% em massa de PES, mantendo-se a temperatura de 45 °C.

Inicialmente, foi realizada uma análise para determinar as melhores condições reacionais para a produção de biodiesel. Foram avaliadas diferentes razões molares (3:1 e 6:1) de etanol:triacilglicerol (TAG) e a influência do teor de água no etanol, comparando as versões anidra (99,8%) e hidratada (95%).

As condições testadas foram:

- Etanol 95% com razão molar etanol:TAG de 3:1;
- Etanol 95% com razão molar etanol:TAG de 6:1, com adição fracionada do etanol nos tempos 0 h e 24 h;
- Etanol 99,8% com razão molar etanol:TAG de 3:1;
- Etanol 99,8% com razão molar etanol:TAG de 6:1, com adição fracionada do etanol nos tempos 0 h e 24 h.

Em experimentos alternativos, o biocatalisador Novozym 435 foi empregado, juntamente com o PES, em concentração de 2% em massa no meio reacional. O etanol (razão molar 3:1) foi adicionado de forma gradual, sendo metade no início da reação e a outra metade após 4 horas de reação.

Alternativamente, a avaliação da produção de ésteres etílicos foi realizada em reações consecutivas. Após a conclusão da primeira reação, o produto foi separado do biocatalisador por centrifugação (5000 rpm por 10 minutos) e, posteriormente, submetido a uma nova reação em batelada utilizando um biocatalisador fresco, ou lavado com etanol,

seco e reutilizado. Para esse processo de reuso, após o término da reação, o biocatalisador foi lavado com 100 mL do solvente, filtrado a vácuo e armazenado em dessecador durante a noite antes de ser utilizado em um novo meio reacional.

O progresso das reações foi acompanhado por meio da coleta de amostras de 100 µL em intervalos de tempo predefinidos. As amostras foram centrifugadas (10.000 rpm por 5 minutos), e o sobrenadante foi armazenado a 4 °C para posterior análise do teor de ácidos graxos livres (AGLs, por titulação) e de ésteres etílicos de ácidos graxos (por cromatografia gasosa).

4.2. Determinação da acidez

A acidez das amostras das reações foi determinada pelo método de titulação. Para isso, 100 µL da amostra foram dissolvidos em 40 mL de uma mistura de etanol:acetona (1:1) e titulados com solução de NaOH 0,04 mol·L⁻¹ até atingir o ponto final de pH 11, utilizando um titulador automático (DG20 Mettler Toledo). A acidez foi calculada pela seguinte equação:

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

Onde:

V = volume de NaOH usado na titulação da amostra (mL);

M = concentração de NaOH (mol·L⁻¹);

AG = massa molar do ácido oleico (g);

m = massa da amostra (g).

A redução da acidez, equivalente à conversão do ácido oleico, foi calculada com base no conteúdo residual de ácidos graxos livres (AGL) em comparação com o teor inicial de AGL no sistema, conforme a equação:

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

Onde:

A_i = teor inicial de AGL alimentado no sistema;

A_f = teor de AGL remanescente no sistema.

A produtividade do sistema foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Produtividade } (\%/\text{h}_r\text{h}_f) = \frac{\text{conv. do ác. oleico}}{\text{h}_r \times \text{h}_f}$$

Onde:

h_r = tempo de reação (h);

h_f = tempo de fermentação (h).

4.3. Determinação do teor de éster etílico

O teor de ésteres etílicos de ácidos graxos foi analisado utilizando um cromatógrafo a gás NEXIS GC-2030 (Shimadzu Co.) equipado com um detector de ionização por chama (FID) e uma coluna capilar Omegawax (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). A temperatura do injetor e do detector foi ajustada para 280 °C. O programa de temperatura do forno iniciou-se em 180 °C por 1 minuto, seguido de um aumento de 2 °C/min até atingir 210 °C, e posteriormente ajustado para 250 °C a uma taxa de 20 °C/min. O gás hélio foi utilizado como gás de arraste, com fluxo de 3 mL·min⁻¹. Amostras de 20 µL foram diluídas em 480 µL de uma solução padrão interna composta por metil heptadecanoato (9 mg·mL⁻¹) em heptano, e 1 µL dessa mistura foi injetado com split de 1:20. O teor de ésteres foi quantificado a partir da área do pico correspondente ao padrão interno.

5. Resultados

5.1. Influência da temperatura de fermentação na capacidade sintética do biocatalisador

Para a obtenção do sólido fermentado (PES) com atividade lipolítica, foram avaliadas três temperaturas de fermentação (30°C , 35°C e 40°C) e dois tempos distintos de fermentação (48 e 72 horas). A produção do PES foi realizada em biorreatores do tipo bandeja, utilizando grãos secos de destilaria com solúveis (GSDS) como substrato, conforme descrito por Aguiieiras et al. (2024).

Após a fermentação, o material obtido foi aplicado em reações de esterificação entre ácido oleico e etanol, conduzidas a 45°C e concentração de biocatalisador de 20% em massa. A conversão do ácido oleico foi utilizada como parâmetro para avaliar a eficiência catalítica do PES sob as diferentes condições testadas.

A Figura 4 mostra que não houve conversões para o PES de 48 h a 30°C nas reações de 2 e 4 horas. No entanto, os melhores resultados foram observados para 72 horas de fermentação a 30°C , com uma produtividade de 0,25% de consumo de ácido oleico por hora de reação por hora de fermentação (Tabela 2). O aumento na temperatura de fermentação reduziu a eficiência do biocatalisador, possivelmente devido à perda de umidade e ao impacto térmico na atividade enzimática, como relatado por Aguiieiras et al. (2024). Com base nesses resultados, o PES obtido sob essa condição foi selecionado para as reações de transesterificação com óleo de milho destilado (OMD).

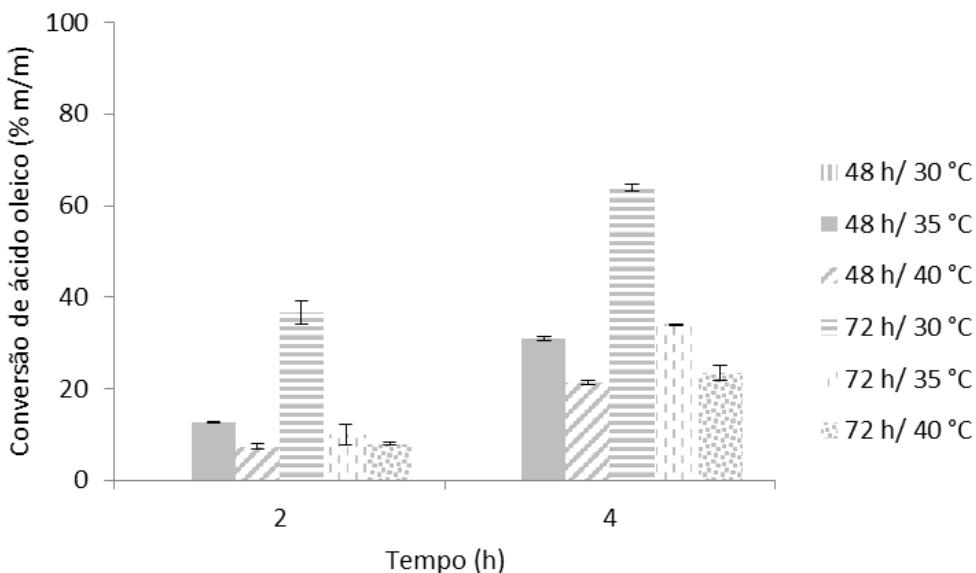


Figura 5: Avaliação do PES de fermentações de 48 e 72 horas a 30, 35 e 40°C em biorreatores do tipo bandeja. Condições das reações: razão molar etanol hidratado:ácido oleico 1:1, 20% de PES a 45°C.

Tabela 2: Comparação das produtividades na fermentação em estado sólido (FES) em biorreatores do tipo bandeja com *R. miehei* após 48 e 72 horas de fermentação a 30, 35 e 40°C.

| Temperatura (°C) | 48h de FES | | |
|------------------|------------|------|------|
| | 30 | 35 | 40 |
| Produtividade* | 0 | 0,13 | 0,08 |
| 2 | 0 | 0,16 | 0,11 |
| 72h de FES | | | |
| Temperatura (°C) | 72h de FES | | |
| | 30 | 35 | 40 |
| Produtividade* | 0,25 | 0,07 | 0,05 |
| 2 | 0,22 | 0,12 | 0,08 |

*conversão de ácido oleico/hora de reação/hora de fermentação.

5.2. Reações de transesterificação do OMD - influência do grau de hidratação do etanol e da razão molar

As reações de transesterificação foram realizadas a fim de avaliar o biocatalisador obtido usando OMD à 45°C com 20% em peso de PES, com base em dados anteriores de síntese de ésteres monoalquilaicos com o mesmo tipo de biocatalisador (Aguieiras et al., 2014; Collaço et al., 2020). A temperatura de 45°C foi escolhida porque proporciona uma

viscosidade ideal para o meio reacional. Temperaturas mais baixas resultam em um aumento da viscosidade, o que poderia dificultar a eficiência da reação.

Os resultados obtidos na análise da razão molar e do álcool mostram que essa escolha impacta diretamente a conversão enzimática, conforme mostrado na Figura 5. A menor razão molar testada (3:1) proporcionou os maiores teores de ésteres em 48h de reação (65%), independentemente do etanol utilizado, o que reforça a importância do controle da proporção entre reagentes para otimização da conversão (Poppe et al., 2015).

O etanol hidratado é considerado uma opção mais viável economicamente e menos tóxica em comparação ao etanol anidro, conforme apontado em estudos anteriores (López-Fernández et al., 2020). Cabe ressaltar que quantidades excessivas de água podem comprometer a estabilidade da enzima, reduzindo sua eficiência ao longo dos ciclos reacionais (López-Fernández et al., 2020).

Além disso, a concentração de etanol no meio reacional deve ser controlada para evitar desestabilização enzimática. Teores elevados podem causar alterações conformacionais na lipase e dificultar a interação entre o substrato e o sítio ativo da enzima, impactando negativamente a conversão de triglicerídeos em biodiesel (Poppe et al., 2015). Esse efeito de inibição causado pelo excesso de álcool pode ser contornado pela estratégia de adição do álcool em etapas, conforme demonstrado em estudos anteriores (Aguieiras et al., 2024).

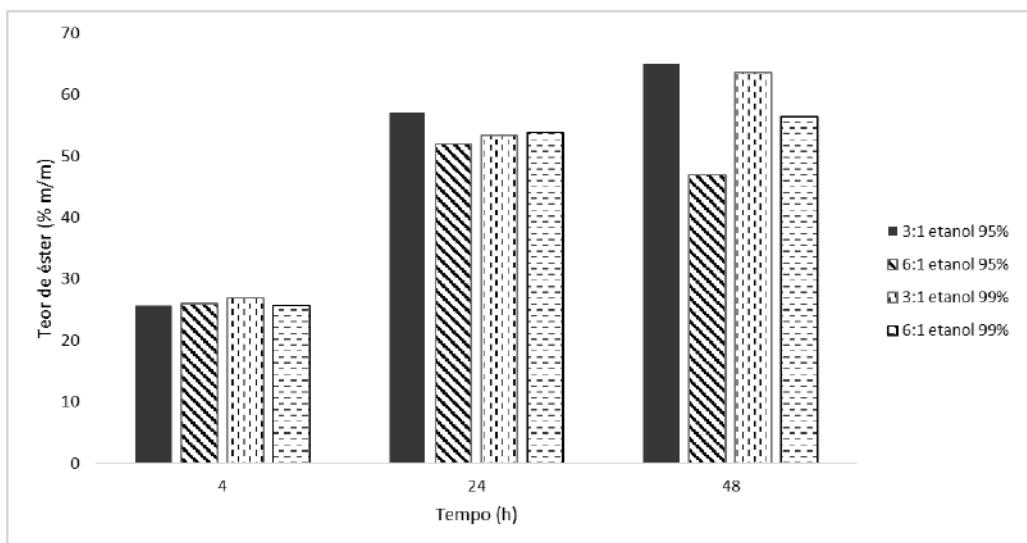


Figura 6: Efeitos da razão molar etanol:TAG e da concentração de etanol na síntese de ésteres etílicos (45°C) a partir de OMD catalisada por PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS. (1) PES 20% em peso, etanol 95%, razão molar etanol:TAG 3:1. (2) PES 20% em peso, etanol 95%, razão molar etanol:TAG 6:1 (½ no tempo 0h e ½ em 24h). (3) PES 20% em peso, etanol 99,8%, razão molar etanol:TAG 3:1. (4) PES 20% em peso, etanol 99,8%, razão molar etanol:TAG 6:1 (½ no tempo 0h e ½ em 24h).

É importante destacar que a matéria-prima foi utilizada diretamente nas reações enzimáticas, sem tratamento prévio. Já o uso de OMD em transesterificação alcalina pode não ser viável em uma única etapa, podendo necessitar de pré-tratamento para eliminar o excesso de ácidos graxos livres.

Como mencionado, uma das estratégias para a aplicação do OMD na produção convencional de biodiesel é a redução da acidez do óleo para valores compatíveis com sua aplicação na catálise alcalina. Dessa forma, a avaliação da redução da acidez do óleo foi realizada sob condições previamente otimizadas para óleo ácido de macaúba (*Acrocomia aculeata*) (Cavalcanti et al., 2025).

A condição avaliada foi: razão molar etanol anidro:AGL = 4:1, utilizando 30% em massa de DFS a 40°C. O álcool foi adicionado em etapas (1/4 em 0h, 1/4 em 2h e 2/4 em 4h) ou no início da reação (0h). A acidez e o teor de éster foram monitorados em 6, 24 e 48 horas de reação. Os resultados do rendimento em ésteres e da acidez estão apresentados nas Figura 6 e 7.

Rendimentos em ésteres de 58% e 51% foram alcançados em 48 horas para o etanol adicionado no início da reação ou em etapas, respectivamente. Os melhores

resultados de acidez foram obtidos em 6 horas na primeira condição (78% de consumo de AGL), resultando em uma acidez de 2,77%. Já nos tempos de 24 e 48 horas, observou-se um aumento na acidez, o que pode estar relacionado à hidrólise dos acilgliceróis em ácidos graxos livres (AGL).

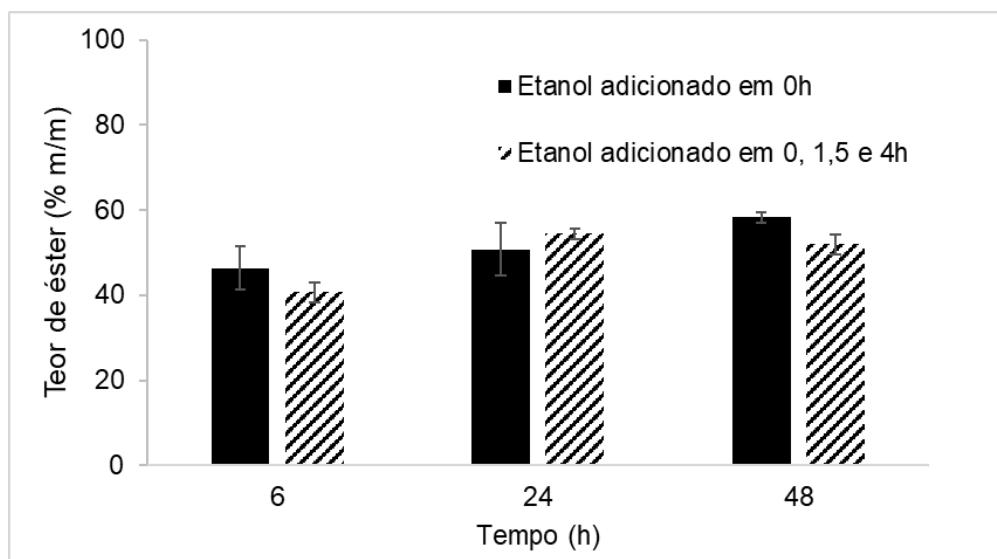


Figura 7: Teor de ésteres na etanólise do OMD em reator batelada (45°C), catalisada pelo FES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (30% em massa), com razão molar etanol hidratado:AGL de 4:1 e adição de etanol em 0h ou em etapas (1/4 em 0h, 1/4 em 1,5h e 2/4 em 4h).

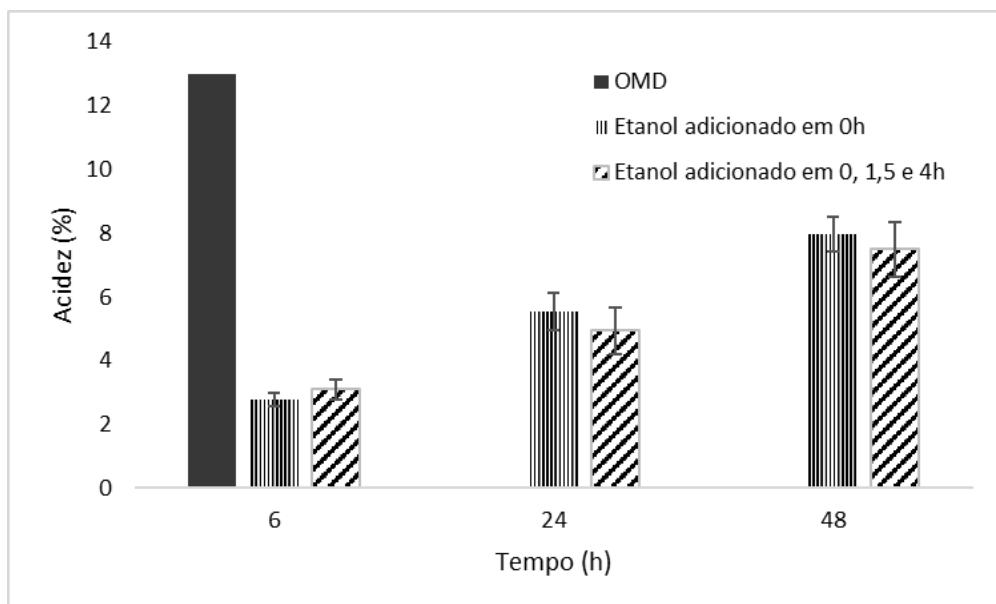


Figura 8: Acidez da etanolise do OMD em reator batelada (45°C), catalisada pelo PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (30% em massa), com razão molar etanol hidratado:AGL de 4:1 e adição de etanol em 0h ou em etapas (1/4 em 0h, 1/4 em 1,5h e 2/4 em 4h).

5.3. Reações consecutivas

Reações consecutivas foram avaliadas como estratégia para aumentar o teor de ésteres. Essa abordagem foi baseada nos resultados positivos observados em (Aguieiras et al., 2022; Ávila et al., 2021), onde a substituição do biocatalisador mostrou-se uma estratégia eficaz para elevar o teor de ésteres etílicos de ácidos graxos.

As reações consecutivas foram conduzidas utilizando um produto com 48,8% de teor de éster (reação conduzida na razão molar etanol:TAG de 3:1) e avaliando duas condições de razão molar na segunda reação (consecutiva): 3:1 e 6:1. Os resultados apresentados na Figura 8 indicam que a razão molar de 3:1 foi a mais eficiente, proporcionando um aumento de 20% no teor de éster em relação à primeira reação.

Os valores de acidez obtidos foram: $2,83\% \pm 0,22$, $1,3\% \pm 0,83$ e $2,5\% \pm 0,12$, para a primeira reação, segunda reação (3:1) e segunda reação (6:1), respectivamente. A redução da acidez do OMD para valores abaixo de 4% indica o potencial do biocatalisador para o pré-tratamento da matéria-prima, visando sua aplicação na rota industrial de produção de biodiesel. A matéria-prima pré-tratada poderia ser misturada com óleo refinado e seguir pelo processo convencional de produção de biodiesel.

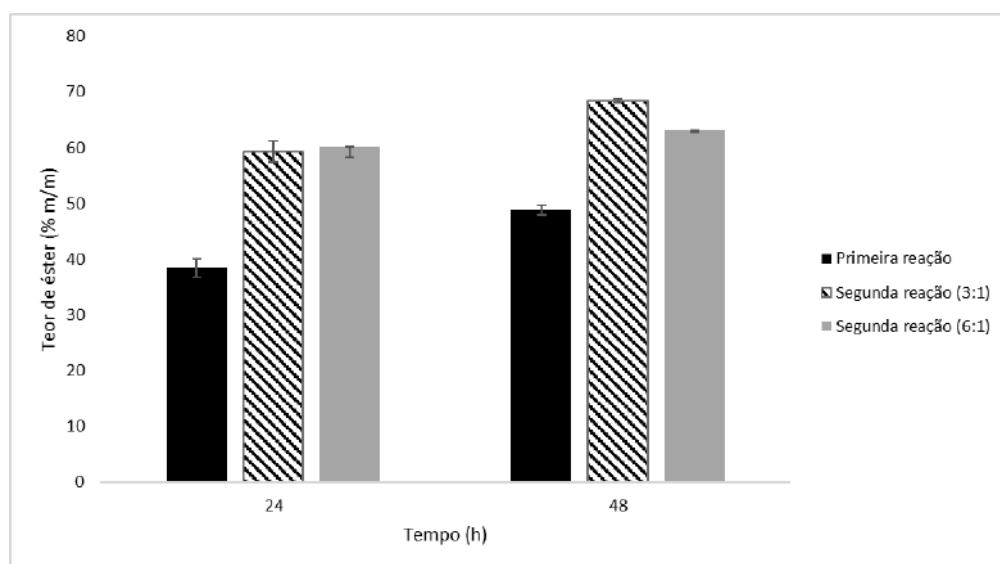


Figura 9: Reação consecutiva de etanolise de OMD em reator batelada (45°C) catalisada por PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (20% em peso) com razão molar etanol hidratado:TAG de 3:1 na primeira reação e 3:1 ou 6:1 na segunda reação.

Posteriormente, a produção de ésteres etílicos foi avaliada em uma razão molar de 3:1, por ter apresentado um melhor resultado como visto anteriormente, mas com uma adição em etapas, sendo 1/2 no início da reação e 1/2 após 4 horas, conforme apresentado em (Ávila et al., 2021). Um teor de éster de 50,4% foi alcançado após 24 horas de reação, conforme mostrado na Figura 9.

Considerando que as lipases de *R. miehei* são lipases regioseletivas sn-1,3, o teor teórico máximo de éster é de 66%, correspondendo à produção de 2 mols de éster por mol de TAG (triacilglicerol) (Heinzl et al., 2022; Lopez-Fernandez et al., 2020). Uma alternativa para superar essa limitação é adicionar uma pequena quantidade de uma lipase não específica em combinação com a lipase regioseletiva sn-1,3, resultando no aumento da taxa de reação e no rendimento de éster (Aguieiras et al., 2022; Yan et al., 2012; Alves et al., 2012; Poppe et al., 2015). Assim, a adição de 2% em peso de Novozym 435, uma lipase não específica, foi avaliada em uma mistura com PES de *R. miehei*.

Essas duas estratégias (reações consecutivas e mistura de biocatalisadores) foram combinadas para melhorar o rendimento final de ésteres. Ao final das reações, o produto foi separado do biocatalisador e, em seguida, submetido a outra reação em batelada. Os resultados são mostrados na Figura 9.

As condições das novas reações realizadas foram as seguintes:

- Primeira reação com PES e segunda reação utilizando PES novo;
- Primeira reação com uma mistura de 20% em peso de PES + 2% em peso de Novozym 435 e segunda reação com uma nova mistura dos biocatalisadores;
- Primeira reação com uma mistura de 20% em peso de PES + 2% em peso de Novozym 435 e segunda reação com a mesma mistura reutilizada dos biocatalisadores (*Mix reuse*);
- Primeira reação com PES e segunda reação utilizando apenas Novozym 435;
- Primeira reação com Novozym 435 e segunda reação utilizando Novozym 435 novo.

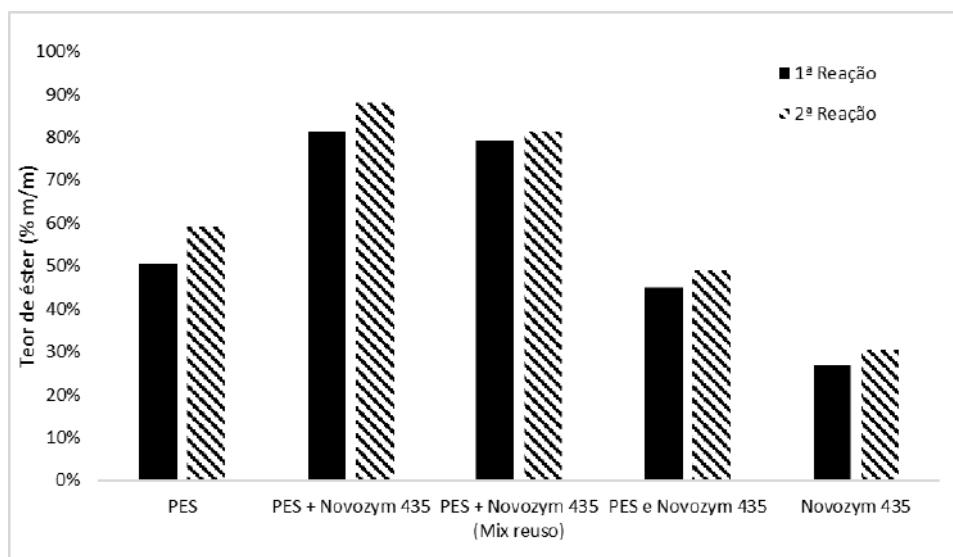


Figura 10: Teor de éster na reação do OMD catalisada pelo PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (20% em massa) em combinação com Novozym 435 (2% em massa). Condição da reação consecutiva: razão molar etanol:TAG de 3:1 (com adição fracionada de etanol, 1/2 em 0h e 1/2 em 4h) a 45 °C por 24h.

Para as reações conduzidas com PES, embora um aumento de quase 10% tenha sido obtido da primeira para a segunda reação, o teor de éster não ultrapassou 60%.

A combinação dos biocatalisadores melhorou o teor de éster de 50,4% para 81,4% na primeira reação e de 59% para 88% na segunda reação. A acidez foi reduzida para 3,7% após a segunda reação com a mistura de enzimas. Já no caso com *mix reuse*, o rendimento final de éster na segunda reação foi de 81,4%, enquanto a acidez final não apresentou diferença significativa (3,5%). Esses resultados demonstram o efeito sinérgico do uso combinado de ambas as enzimas.

Por outro lado, o uso de PES na primeira reação (24 h) seguido de Novozym 435 na reação subsequente (6h - segunda reação) não foi promissor, já que o teor de éster foi de apenas 49%, inferior ao obtido utilizando apenas o PES. Quando Novozym 435 foi usada sozinha, um rendimento de 30,3% de éster foi alcançado após duas reações consecutivas.

Embora o Novozym 435 tenha alta atividade de esterificação ($4135,4 \pm 386,3$ U/g) (Aguieiras et al., 2022), esses resultados podem estar relacionados às limitações de ácidos graxos insaturados de cadeia longa no acesso ao sítio ativo dessa lipase. Além disso, deve-se considerar os efeitos de compostos semelhantes a detergentes, como ácidos graxos, glicerídeos parciais e fosfolipídios, na atividade da enzima imobilizada (Ortiz et al., 2019). Esses compostos podem ser adsorvidos na matriz fermentada sólida, causando problemas de difusão e dificultando o acesso dos substratos às lipases (Ortiz et al., 2019; Aguieiras et al., 2022; Lopez et al., 2016).

Em reações de transesterificação catalisadas por lipases, o subproduto glicerol também pode formar um "revestimento hidrofílico" na superfície da enzima, afetando negativamente a atividade enzimática (Véras et al., 2011; Heinzl et al., 2022).

Com o objetivo de atingir o limite mínimo exigido para a especificação de biodiesel (96,5%), o produto final das três condições que apresentaram os melhores resultados — PES, PES + Novozym 435 e PES + Novozym 435 (*Mix Reuse*) — foi submetido a uma terceira reação. Os triglicerídeos remanescentes foram calculados, e a razão molar etanol:TAG de 3:1 foi ajustada em cada reação consecutiva. Os resultados são apresentados na Figura 10.

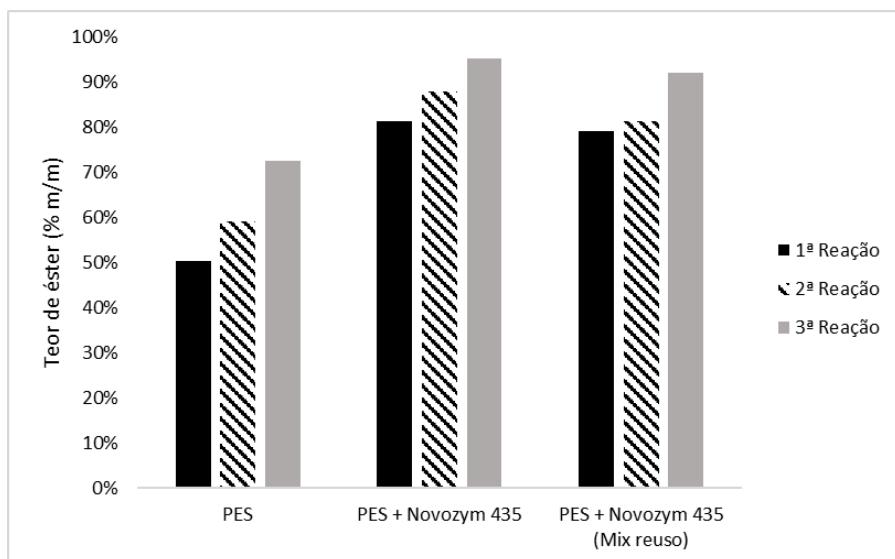


Figura 11: Teor de éster na reação do OMD catalisada pelo PES de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS (20% em massa) em combinação com Novozym 435 (2% em massa) na terceira reação consecutiva. Condição da reação: razão molar etanol:TAG remanescente de 3:1 (com adição fracionada de etanol, 1/2 em 0h e 1/2 em 4h) a 45 °C por 24h.

Na terceira reação consecutiva, a utilização de PES novo (20% em peso) + Novozym 435 (2% em peso) resultou em um teor de éster de 95,2%. Já na condição em que os biocatalisadores reutilizados (*Mix Reuse*) foram empregados, houve um aumento de aproximadamente 17% no rendimento de éster após a terceira reação, atingindo 92,1% de éster. O maior aumento observado (22%) ocorreu na reação com PES novo (20% em peso), que alcançou um teor de éster de 72,4%.

Estudos anteriores mostram que a combinação de duas preparações comerciais (NS 40086, preparação comercial imobilizada de lipase de *R. miehei*, e Novozym 435, lipase B de *C. antarctica*) resulta em excelentes teores de ésteres (>96%) (Aguieiras et al., 2022). Neste estudo, foi possível substituir uma das enzimas comerciais (NS 40086) por um biocatalisador não comercial (PES). Além disso, foi possível reutilizar essa mistura de biocatalisadores no processo em três etapas, o que é um fator importante para a redução de custos.

O aprimoramento genético de enzimas para aumentar sua atividade e estabilidade, a utilização de reatores alternativos para a remoção contínua de glicerol como subproduto e o desenvolvimento de sistemas "one-pot" tanto para a produção do biocatalisador quanto para sua aplicação em reatores de leito fixo são estratégias que podem reduzir ainda mais os tempos de processamento e aumentar a produtividade do processo.

5.4. Reutilização do biocatalisador

A capacidade sintética do PES reutilizado foi avaliada na reação de esterificação entre etanol hidratado e ácido oleico. Dois solventes foram escolhidos (etanol anidro, $\log P = -0,30$, e hexano, $\log P = 3,5$) e utilizados para lavar o PES antes da subsequente reação de esterificação.

A conversão de ácido oleico permaneceu acima de 60% desde a primeira reação até o quarto ciclo de reutilização. A queda na conversão de ácido oleico foi mais acentuada quando o etanol foi usado como solvente de lavagem (Figura 11).

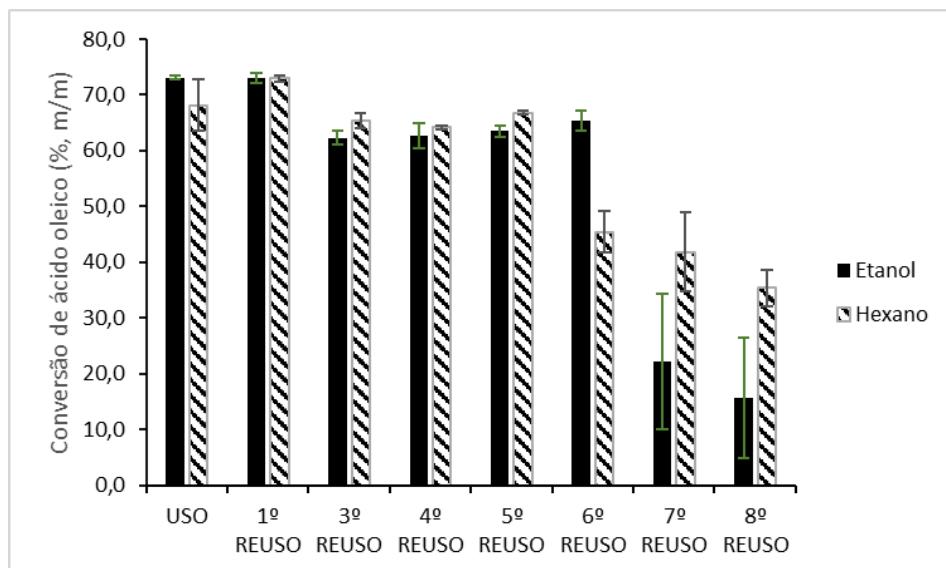


Figura 12: Capacidade de esterificação do PES reutilizado de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS, lavado com etanol anidro ou hexano. Condição da reação: razão molar etanol:ácido oleico de 1:1, 20% em massa de PES a 45 °C por 4h.

Vale destacar que as propriedades da matriz na qual a enzima está adsorvida, como porosidade e hidrofobicidade, podem impactar significativamente a reutilização do biocatalisador.

De acordo com Silva et al. (2019), o uso de um solvente não polar é recomendado para evitar a desnaturação da enzima e, ao mesmo tempo, facilitar a remoção de compostos hidrofóbicos que poderiam ser adsorvidos na superfície do biocatalisador. No entanto, os autores observaram uma redução significativa na conversão de ácido oleico após o primeiro ciclo quando o hexano foi usado para lavar o PES com atividade de lipase de *Yarrowia lipolytica* obtido por FES em farelo de soja. Por outro lado, de acordo com o

estudo feito em Aguiéiras et al., 2014, foi possível obter dez ciclos sucessivos de reutilização do PES de *R. miehei* produzido em torta de babaçu.

Como ambos os solventes demonstraram capacidade de manter a estabilidade do biocatalisador em reações de esterificação, o etanol foi selecionado para a etanólise do OMD devido ao seu custo-benefício e caráter ambientalmente amigável. Um rendimento de éster de 48,6% foi alcançado na reação inicial de transesterificação, seguido por reduções para 37,8%, 17% e 10% nas reações de reutilização de 1º, 2º e 3º ciclos, respectivamente. Os valores de acidez foram de 3,8%, 3,9%, 5,3% e 6,5% para a reação inicial de transesterificação e para os 1º, 2º e 3º ciclos de reutilização, respectivamente (Figura 12).

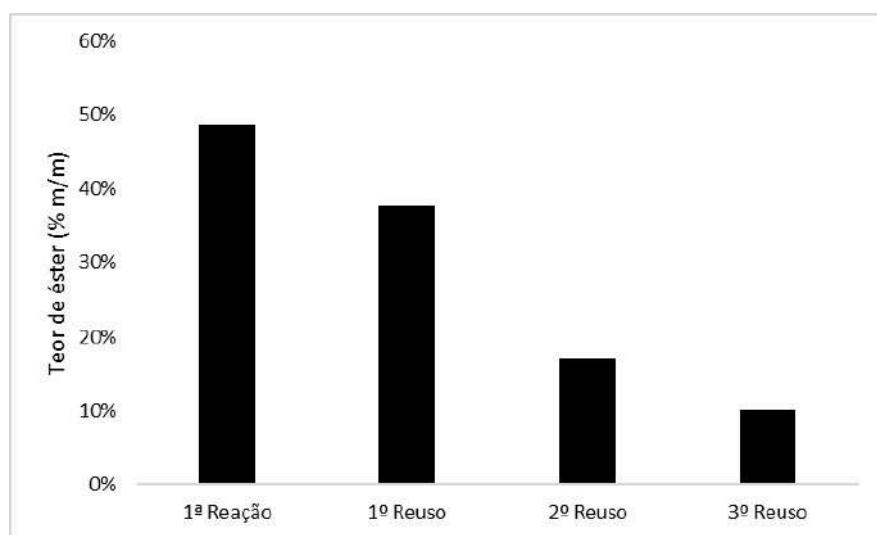


Figura 13: Teor de éster na reação do OMD catalisada pelo PES reutilizado de *Rhizomucor miehei* produzido em GSDS. Condição da reação: razão molar etanol:TAG de 4:1 (com adição fracionada de etanol, 1/2 em 0h e 1/2 em 4h), 20% em massa de PES a 45 °C por 24h.

Esses resultados podem ser atribuídos à adsorção de componentes do OMD (TAG, AGL e glicerol) no PES, que podem permanecer apesar dos procedimentos de lavagem. Ávila et al. (2021) observaram resultados semelhantes para PES de torta de macaúba. Esse comportamento não foi observado em reações de esterificação, já que os componentes predominantes potencialmente retidos na superfície do biocatalisador são polares (Silva et al., 2019).

Também é importante notar que, ao contrário do ácido oleico comercial, que possui alto grau de pureza (>98%), o OMD contém outros componentes em menores quantidades (Aguieiras et al., 2022), como glicoproteínas, fosfolipídios e glicolipídios. Esses

componentes podem ser adsorvidos na superfície do biocatalisador mesmo após a lavagem. Como um OMD novo foi usado em cada lote, o acúmulo desses compostos ao longo dos ciclos de reutilização pode levar a uma diminuição na atividade enzimática.

Vale ressaltar que, para as reações consecutivas, o biocatalisador pôde ser reutilizado após a lavagem com etanol. Esses resultados mostram que a composição do meio reacional influencia a manutenção da atividade do biocatalisador ao longo das reutilizações. Um meio com alto teor de éster pode proporcionar uma melhor solubilidade dos componentes que afetam a atividade da enzima.

A conversão de todos os glicerídeos do OMD em AGL, seguida de esterificação com etanol (rota de hidroesterificação), pode ser considerada um processo alternativo para converter OMD em ésteres etílicos, visando maximizar a reutilização do biocatalisador.

6. Conclusão

Este estudo propôs uma abordagem sequencial para a valorização de coprodutos do etanol de milho, resultando na produção de um insumo de alto valor: ésteres etílicos derivados do OMD, em conformidade com o conceito de biorrefinaria.

O biocatalisador, desenvolvido em um reator do tipo bandeja, demonstrou alta eficiência, convertendo mais de 70% do ácido oleico em ésteres etílicos em apenas quatro horas de reação. Já o teor de ésteres a partir do OMD superou 95%, resultado alcançado por meio da combinação de reações consecutivas e da adição de uma fração reduzida de um biocatalisador comercial. Dado que o GSDS é amplamente utilizado como aditivo para ração animal, este estudo reforça seu potencial para aplicações mais amplas, possibilitando a integração dos processos de produção de etanol, biodiesel e enzimas. Para garantir a viabilidade e otimização desse processo, ainda são necessárias investigações complementares, incluindo análises da composição do produto final, análises de ciclo de vida e estudos econômicos, visando identificar possíveis desafios, gargalos e oportunidades de aprimoramento.

7. Referências bibliográficas

ABIOVE. Anuário da Abiove 2017. São Paulo: Abiove, 2017.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP).

Especificação do biodiesel. Disponível em:

<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/biodiesel/especificacao-do-biodiesel>. Acesso em: 3 fev. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP).

Produção e fornecimento de biocombustíveis – Biodiesel. Disponível em:

<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel>. Acesso em: 3 fev. 2024.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS.

Estatísticas 2023 - Biodiesel. Brasília: ANP, 2023.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Resolução ANP nº 920, de 4 de abril de 2023.

Dispõe sobre a especificação de qualidade do biodiesel para uso como combustível. *Diário Oficial da União*, Brasília, 5 abr. 2023.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Fatty acid ethyl esters production from distillers corn oil by enzymatic catalysis. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 99, n. 5, p. 393–405, 2022. DOI: 10.1002/aocs.12582.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Integrated biodiesel production using corn oil and solid-state fermentation lipases. *Journal of Renewable Energy*, v. 150, p. 1124-1135, 2024.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Integrated process for lipase production and biodiesel synthesis using distillers dried grains with solubles (DDGS) and corn oil. *Industrial Crops and Products*, v. 209, p. 118028, 2024.

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. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.06.069.

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, 2019. DOI: 10.1016/J.RENENE.2018.06.095.

AGUIEIRAS, E. C. G. et al. Integrated process for a new sequential valorization of corn ethanol production by-products: Production of fermented solid with lipase activity, ethyl esters, and animal feed. *Industrial Crops & Products*, v. 209, p. 118028, 2024. DOI: 10.1016/j.indcrop.2024.118028.

AKOH, C. C. et al. Enzymatic Approach to Biodiesel Production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 8995-9005, 2007.

ALVES, J. S. et al. Combi-lipase for heterogeneous substrates: a new approach for hydrolysis of soybean oil using mixtures of biocatalysts. *RSC Advances*, v. 4, p. 6863–6868, 2012. DOI: 10.1039/C3RA45969A.

ÁVILA, S. N. S. et al. Development of a green integrated process for biodiesel esters production: use of fermented macaúba cake as biocatalyst for macaúba acid oil transesterification. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 98, p. 825–835, 2021. DOI: 10.1002/aocs.12522.

ANP. Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2009. Estabelece regras para a comercialização de biodiesel para atendimento da adição obrigatória. *Diário Oficial da União*, Brasília, 26 ago. 2009.

ASTM INTERNATIONAL. Standard Specification for Biodiesel Fuel Blend Stock (B100) for Middle Distillate Fuels. *ASTM D6751-08*. West Conshohocken: ASTM International, 2008.

BNB - Banco do Nordeste. Mercado de Etanol no Brasil: Análise e Perspectivas. Recife: BNB, 2020. Disponível em: https://www.bnb.gov.br/s482-dspace/bitstream/123456789/1196/1/2020_CDS_121.pdf. Acesso em: 28 jan. 2025.

BNDES Setorial. Rio de Janeiro: BNDES, 2007. n. 25, p. 5-38.

BRASIL. Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005. Dispõe sobre a inclusão de biodiesel na matriz energética brasileira. *Diário Oficial da União*, Brasília, 14 jan. 2005.

BRASIL. Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014. Altera a Lei nº 11.097, de 13 de janeiro de 2005, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 set. 2014.

BRASIL. Lei nº 13.263, de 23 de março de 2016. Altera a Lei nº 13.033, de 24 de setembro de 2014, para dispor sobre os percentuais de adição de biodiesel ao óleo diesel comercializado no território nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, 24 mar. 2016.

BRASIL. Ministério de Minas e Energia. Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel. Brasília, 2004.

BRASIL. Resolução CNPE nº 16, de 24 de outubro de 2018. Estabelece diretrizes para a política energética nacional. *Diário Oficial da União*, Brasília, 25 out. 2018.

BUENAVISTA, R. M. E. et al. Utilization of Distiller's dried grains with solubles: A review. *Journal of Agriculture and Food Research*, v. 5, p. 100195, 2021.

CANAKCI, M. et al. Biodiesel production from oils and fats with high free fatty acids. *Transactions of the ASAE*, v. 44, n. 6, p. 1429-1436, 2001.

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Use of *Rhizomucor miehei* fermented babassu cake (an agro-product residue) as efficient biocatalyst for macaúba acid oil deacidification in solvent-free medium: Transforming a non-edible crop product in a favourable biodiesel feedstock. *Process Biochemistry*, v. 148, p. 176–182, 2025.

CAVALCANTI, E. P. et al. Process optimization for corn oil transesterification using enzymatic catalysis. *Bioresource Technology*, v. 200, p. 140-148, 2005.

CAVALCANTI, E. P. et al. Solid-state fermentation using agro-industrial residues for enzyme production. *Journal of Biotechnology*, v. 117, n. 1, p. 85-92, 2005.

CHEN, L.; ZHANG, Y.; LI, Y. Production of biodiesel from distiller's corn oil. *Journal of Renewable Energy*, v. 2019, p. 1-9, 2019.

CNA BRASIL. Milho invade as indústrias de produção de etanol. 2024. Disponível em: <https://www.cnabrasil.org.br/noticias/milho-invade-as-industrias-de-producao-de-etanol>. Acesso em: 3 fev. 2024.

COLLAÇO, A. C. A. et al. Experimental study and preliminary economic evaluation of enzymatic biodiesel production by an integrated process using co-products from palm (*Elaeais guineensis* Jaquim) industry. *Industrial Crops and Products*, v. 157, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112904.

COMISSÃO EUROPEIA. Diretiva 2018/2001/UE do Parlamento Europeu e do Conselho. Bruxelas: Comissão Europeia, 2020.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. Safra 2020/21. Brasília: Conab, 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>. Acesso em: 28 jan. 2025.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Relatório da safra de etanol 2024. Brasília: Conab, 2024.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Projeção 2024/2025. Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/E-book_BoletimZdeZSafrasZcana_3ZlevZ2024.pdf. Acesso em: 3 fev. 2024.

CONAB. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. Brasília: Conab, 2023.

EMBRAPA. Etanol. Agência de Informação Tecnológica, Embrapa, [s.d.]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/agroenergia/p-d-e-i/etanol>. Acesso em: 27 jan. 2025.

FAPESP. Produção de biodiesel pode ser acelerada com novo tipo de catalisador. 2024. Disponível em: <https://agencia.fapesp.br/producao-de-biodiesel-pode-ser-acelerada-com-novo-tipo-de-catalisador/42171>. Acesso em: 3 fev. 2024.

FERRARI, R. A. et al. Biodiesel from soybean oil: characterization and consumption in an energy generator. *Renewable Energy*, v. 30, n. 5, p. 795-803, 2005.

FREEDMAN, B. et al. Transesterification kinetics of soybean oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 63, n. 10, p. 1375-1380, 1986.

HANOVER, R. T. et al. Wet milling of corn for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 97, n. 2, p. 251-261, 2007.

HEINZL, G. C. et al. Integrated bioprocess for structured lipids, emulsifiers and biodiesel production using crude acidic olive pomace oils. *Bioresource Technology*, v. 346, 2022. DOI: 10.1016/j.biortech.2021.126646.

INSTITUTO FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE (IFRN). Aplicação de catalisadores heterogêneos na produção de biodiesel. 2024. Disponível em: <https://www2.ifrn.edu.br/ojs/index.php/HOLOS/article/download/5195/pdf/15966>. Acesso em: 3 fev. 2024.

JOHNSON, L. A. et al. Wet milling: The basis for corn dry milling and ethanol production. *Cereal Chemistry*, v. 80, n. 3, p. 351-355, 2003.

KILDIRAN, M. et al. Synthesis of biodiesel from vegetable oils by using acid catalysts. *Energy Sources*, v. 18, n. 4, p. 429-435, 1996.

KIM, J. et al. Characteristics of distiller's dried grains with solubles (DDGS) from corn ethanol production. *Journal of Food Science*, v. 83, n. 5, p. S1448-S1455, 2018.

KUMAR, A. et al. Distillers Corn Oil (DCO): A Study of Recent Advancements in the Processing Techniques for this Unique Fuel Source. *Journal of Renewable Energy*, v. 2020, p. 1-15, 2020.

KUMAR, D. et al. Advances in lipase production through solid-state fermentation: Current status and perspectives. *Biotechnology Advances*, v. 36, n. 8, p. 1207-1220, 2018.

KUMAR, D. et al. Biodiesel production from corn oil: Challenges and advances. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 81, p. 2946-2959, 2018.

KUMAR, D. et al. Dry grind process for ethanol production from corn. *Journal of Cleaner Production*, v. 172, p. 2511-2518, 2018.

LEHNINGER, A. Princípios de Bioquímica. 7^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2021.

LEVENSPIEL, O. Chemical Reaction Engineering. 3rd ed. New York: Wiley, 1999.

LI, Y. et al. Extraction and characterization of distiller's corn oil. *Journal of Food Engineering*, v. 241, p. 112-119, 2019.

LIU, Y. et al. Enzyme-Catalyzed Biodiesel Production: A Review of the Current Status and Future Perspectives. *Energies*, v. 12, n. 11, p. 1-22, 2019. DOI: 10.3390/en12112231.

MA, F. et al. Biodiesel production: a review. *Bioresource Technology*, v. 70, n. 1, p. 1-15, 1999.

MARTINS, F. A. et al. Análise da competitividade da produção de etanol de milho no Brasil. *Revista de Economia e Agronegócios*, v. 18, n. 2, p. 1-15, 2020.

MATHEW, G. M. et al. Recent advances in biodiesel production: challenges and solutions. *Science of the Total Environment*, v. 794, nov. 2021. Article number 148751. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148751>. Acesso em: 31 de jan. 2025.

MILANEZ, A. Y. et al. A produção de etanol pela integração do milho-safrinha às usinas de cana-de-açúcar: avaliação ambiental, econômica e sugestões de política. *Revista do BNDES*, v. 21, n. 41, p. 147-208, 2014.

MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA (MME). Produção de biocombustíveis cresce no Brasil e alcança recorde histórico. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/noticias/producao-de-biocombustiveis-cresce-no-brasil-e-alcanca-recorde-historico>. Acesso em: 3 fev. 2024.

MOHANTY, A. K. et al. Biofibers, biodegradable polymers and biocomposites: An overview. *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 276, n. 1, p. 1-24, 2000.

MOSER, B. R. Biofuels. In: KOLE, C.; SANTOS, J. C. P. (Ed.). *In Vitro Cellular & Developmental*.

NOVOZYMES. Increasing recovery of distiller's corn oil. Novozymes, 2020. Disponível em: (link unavailable). Acesso em: 10 fev. 2023.

OECD/FAO. Agricultural Outlook 2020-2029. Paris: OECD/FAO, 2020. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2020-2029_1112c23b-en.html. Acesso em: 28 jan. 2025.

OECD/FAO. OECD-FAO Agricultural Outlook 2024-2033. Paris: OECD/FAO, 2024. Disponível em: https://www.oecd.org/en/publications/oecd-fao-agricultural-outlook-2024-2033_4c5d2cfb-en/full-report/component-13.html#chapter-d1e22142-a6249d180a. Acesso em: 28 jan. 2025.

PANDEY, A. et al. Current developments in solid-state fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, v. 17, n. 1, p. 15-20, 2019.

PANDEY, A. et al. Supercritical fluid extraction and biodiesel synthesis from corn oil. *Fuel Processing Technology*, v. 184, p. 74-85, 2019.

PATEL, A. et al. Sustainable enzyme production using solid-state fermentation: Recent advances and challenges. *Journal of Cleaner Production*, v. 250, p. 119564, 2020.

PORTAL DO AGRONEGÓCIO. Brasil e EUA lideram a produção global de etanol, mas hegemonia é norte-americana. 2024. Disponível em: <https://www.portaldoagronegocio.com.br/energias-renovaveis/etanol/noticias/brasil-e-eua-lideram-a-producao-global-de-etanol-mas-hegemonia-e-norte-americana>. Acesso em: 3 fev. 2024.

PRIOR. O Brasil e o segundo maior produtor de etanol combustível do mundo. 2024. Disponível em: https://www.prio.pt/pt/prio.pt/blog_236.html?idb=504. Acesso em: 3 fev. 2024.

RENEWABLE FUELS ASSOCIATION. Ethanol Production Process. Washington: Renewable Fuels Association, 2020.

SEABRA, J. E. A. et al. Avaliação do potencial de redução de gases de efeito estufa na produção de etanol de milho no Brasil. *Revista Brasileira de Ciência Ambiental*, v. 55, p. 1-12, 2020.

SHAPOURI, H. J. et al. Energy balance of corn ethanol revisited. In: ASAE (Ed.). *Conference proceedings liquid fuel conference*. St. Joseph: ASAE, 1996. p. 253-259.

SILER-MARINKOVIC, S. et al. Transesterification of sunflower oil in situ. *Fuel*, v. 77, n. 12, p. 1389-1391, 1998.

SILVA, R. F. et al. Análise da rentabilidade da produção de etanol de milho em diferentes regiões do Brasil. *Revista de Administração Rural*, v. 47, n. 2, p. 1-15, 2019.

SINGH, V. et al. Ethanol production from corn by dry grind process. *Journal of Biotechnology*, v. 155, p. 151-158, 2011.

SOLOMONS, T. W. G. et al. *Química Orgânica*. 10^a ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011.

UDOP. Etanol: 2 países são líderes mundiais em produção do biocombustível. 2024. Disponível em:
<https://www.udop.com.br/noticia/2024/09/23/etanol-2-paises-sao-lideres-mundiais-em-producao-do-biocombustivel>. Acesso em: 3 fev. 2024.

UDOP. Etanol: 2 países são líderes mundiais em produção do biocombustível, um deles é o Brasil. 2024. Disponível em:
<https://www.udop.com.br/noticia/2024/09/23/etanol-2-paises-sao-lideres-mundiais-em-producao-do-biocombustivel-1-deles-e-o-brasil.html>. Acesso em: 3 fev. 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS (UFSCar). Patentes – Catalisador para biodiesel. 2024. Disponível em:
<https://www.inovacao.ufscar.br/pt-br/news/patentes/167-catalisador-biodiesel>. Acesso em: 3 fev. 2024.

VELJKOVIĆ, V. B. et al. Biodiesel production from corn oil: A review. *Fuel*, v. 210, p. 533-546, 2018.

VELJKOVIĆ, V. B. et al. Biodiesel production from corn oil: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 91, p. 531-548, 2018.

WANG, M. et al. Fuel-cycle fossil energy use and greenhouse gas emissions of fuel ethanol produced from U.S. Midwest corn. Argonne: Argonne National Laboratory, 1997.

WANG, X. et al. Effects of distiller's dried grains with solubles (DDGS) on growth performance and nutrient digestibility in pigs. *Journal of Animal Science*, v. 98, n. 10, p. 5531-5538, 2020.

WANG, Y. et al. Phytochemicals and health benefits of corn oil. *Journal of Food Science*, v. 84, n. 5, p. S1478-S1486, 2019.

ZARRINBAKHSH, N. et al. Fundamental studies on water-washing of the corn ethanol coproduct (DDGS) and its characterization for biocomposite applications. *Biomass Bioenergy*, v. 55, p. 251-259, 2013.

ZHANG, Y. et al. Fatty acid composition and antioxidant activity of distiller's corn oil. *Journal of Food Science*, v. 85, n. 5, p. S1448-S1455, 2020.