



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

CINTHIA SILVA ALMEIDA

**SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE ÓLEOS
VEGETAIS E ÓLEO FÚSEL, UTILIZANDO ENZIMAS IMOBILIZADAS EM
COMPÓSITO DE LIGNINA DO BAGAÇO DE CAJU**

FORTALEZA

2025

CINTHIA SILVA ALMEIDA

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS E
ÓLEO FÚSEL, UTILIZANDO ENZIMAS IMOBILIZADAS EM COMPÓSITO DE
LIGNINA DO BAGAÇO DE CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha.

FORTALEZA

2025

CINTHIA SILVA ALMEIDA

SÍNTESE ENZIMÁTICA DE BIOLUBRIFICANTES A PARTIR DE ÓLEOS VEGETAIS E
ÓLEO FÚSEL, UTILIZANDO ENZIMAS IMOBILIZADAS EM COMPÓSITO DE
LIGNINA DO BAGAÇO DE CAJU

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química. Área de concentração: Processos Químicos e Bioquímicos.

Aprovada em: 29/08/2025.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Maria Valderez Ponte Rocha (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dr. Rodolpho Ramilton de Castro Monteiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Adriano Mendes Aguiar
Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL)

A Deus.

Aos meus pais, minha avó e meu irmão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder força, ânimo e coragem para continuar, mesmo diante de tantos desafios que poderiam ter me feito desistir. Aos meus pais, Benedita Alcivaneide Costa Almeida Silva e Francisco Agardenio Lima da Silva, sou profundamente grata por todo o suporte, conselhos e pela fortaleza que sempre representaram em minha vida. Sem vocês, nada disso teria sido possível.

À Prof^a. Dr^a. Maria Valderez Ponte Rocha, expresse minha sincera gratidão por me acolher em seu grupo de pesquisa (LBVBIO) e proporcionar uma vivência diária em ambiente de laboratório, o que contribuiu significativamente para meu desenvolvimento acadêmico e minha autonomia. Agradeço pela atenção, pelo tempo dedicado à orientação deste trabalho e, por ter feito parte de um momento tão desafiador e marcante da minha trajetória.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr. Rodolpho Ramilton de Castro Monteiro e ao Prof. Dr. Adriano Mendes Aguiar pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas de laboratório, Larissa Xavier do Nascimento, Estefânia de Sousa Moreira, Gabriel Fagundes Simão, Marcos Vinícius Maia de Andrade, Emanuel Roberto Souza dos Santos e Stefanny Freitas de Oliveira. Agradeço por toda a ajuda prestada ao longo desta pesquisa, pelos ensinamentos compartilhados, reflexões e sugestões que contribuíram para o aprimoramento do estudo, e pelas risadas, festinhas que tornaram os dias mais leves e agradáveis.

Agradeço, igualmente, à colega Ravena Casemiro Oliveira, pela companhia nos longos horários da pesquisa até tarde da noite, pelas caronas de Uber “muitas vezes insistindo para que eu não pagasse”. Também agradeço ao colega Carlos Alberto Chaves Girão Neto, pela atenção, disponibilidade e pelos valiosos ensinamentos compartilhados ao longo da realização deste trabalho. A generosidade e o apoio de ambos fizeram toda a diferença nesse percurso.

Agradeço ao Núcleo de Pesquisa em Lubrificantes (NPL) pela disponibilização da infraestrutura necessária para a realização das análises físico-químicas, e ao Rodolpho, pelos valiosos ensinamentos durante a realização dos experimentos. Estendo meus agradecimentos à Prof^a. Dr^a. Tigressa Helena pela importante contribuição nas análises de cromatografia gasosa.

“Agora pois, ó Deus meu, graças de dou, e louvo o nome da tua glória”. I Crônica 29:13.

"Até aqui nos ajudou o senhor". 1 Samuel, 07:12 - Parte B.

RESUMO

Os impactos ambientais causados pelo uso de lubrificantes derivados do petróleo têm despertado crescente interesse na busca por alternativas mais sustentáveis. Neste contexto, os biolubrificantes surgem como uma opção promissora, podendo ser obtidos tanto a partir de fontes sintéticas quanto por matérias-primas renováveis. Dentre estas, destacam-se os ácidos graxos extraídos de óleos vegetais, que conferem aos lubrificantes propriedades biodegradáveis e menor toxicidade ao meio ambiente, em comparação aos lubrificantes de origem mineral. Diante disso, diversas estratégias para a síntese de biolubrificantes vêm sendo exploradas, incluindo o uso de biocatalisadores. Neste contexto, este estudo teve dois objetivos principais: i) avaliar a obtenção de ácidos graxos por hidrólise enzimática catalisada por lipase de *Rhizomucor miehei*, visando uma futura aplicação; e ii) avaliar a síntese de biolubrificantes utilizando ácidos graxos livres (AGLs), obtidos por hidrólise química, em combinação com óleo fúsel, um resíduo da indústria sucroalcooleira, como fonte alcoólica. Inicialmente, foram realizados os estudos de hidrólise enzimática dos óleos comerciais de soja, canola, girassol e algodão, por lipase de *R. miehei* na sua forma livre e imobilizada em suporte magnético obtido da lignina do bagaço de caju (Lig-Mag), para produção de ácidos graxos livres. Para isso, inicialmente, a lignina foi extraída do bagaço de caju, seguida pelo processo de magnetização e posterior imobilização da enzima, avaliando-se duas cargas enzimáticas: 0,5 mg e 5 mg de proteína por g de suporte, em que os biocatalisadores obtidos foram nomeados Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5, respectivamente. Nos ensaios de hidrólise, avaliaram razões molares óleo: água de 1:1, 1:2 e 1:3, a 50 °C, 150 rpm, durante 24 h. Como resultado, observou-se que as maiores porcentagens de hidrólise foram obtidas com os óleos de algodão e canola e o biocatalisador Lig-Mag_RML_5 apresentou a melhor performance, obtendo uma porcentagem de hidrólise de $62,2 \pm 1,8\%$ para o óleo de algodão e $53,4 \pm 1,4\%$ para o óleo de canola. Após, foi realizado o estudo para avaliar a eficiência da enzima lipase B de *Candida antarctica*, na sua forma livre e imobilizada no suporte Lig-Mag (Lig-Mag_CALB), na reação de esterificação utilizando (AGLs) obtidos por hidrólise química e o óleo fúsel como mistura de álcoois. As reações ocorreram nas razões molares ácido: álcool de 1:1 e 1:3, às temperaturas de 40 °C e 50 °C, por 48 h a 150 rpm. Nas reações conduzidas usando Lig-Mag_CALB, as maiores conversões foram obtidas com a razão molar de 1:1 e temperatura de 40 °C, atingindo conversão de $72,4 \pm 1,3\%$ e $73,9 \pm 0,6\%$ usando os AGLs do óleo de algodão e do óleo de canola, respectivamente. O biocatalisador apresentou satisfatória estabilidade operacional,

alcançando conversão relativa de 66,8% com os AGLs do óleo de algodão e 64,5% com os AGLs do óleo de canola, após cinco ciclos avaliados. Além disso, quando armazenado a 4 °C, manteve 85% de sua atividade catalítica após 27 dias. Ambos os biolubrificantes obtidos a partir dos óleos de canola e algodão apresentaram propriedades físico-químicas promissoras, atendendo aos requisitos técnicos para formulações de lubrificantes. Portanto, a hidrólise enzimática constitui uma alternativa viável para obtenção de ácidos graxos livres, enquanto a hidroesterificação se apresenta como uma estratégia eficiente para a síntese de ésteres com propriedades lubrificantes. A utilização de resíduos como óleo fúsel e lignina do bagaço de caju contribui para o desenvolvimento de processos mais sustentáveis, com potencial para gerar produtos biodegradáveis, não tóxicos e agregar valor à subprodutos da indústria.

Palavras-chave: Óleos vegetais; óleos fúsel; lignina; lipases, biolubrificantes.

ABSTRACT

The environmental impacts of petroleum-based lubricants have sparked growing interest in the search for more sustainable alternatives. In this context, biolubricants emerge as a promising option, available from both synthetic and renewable sources. Among these, fatty acids extracted from vegetable oils stand out, conferring biodegradable properties and lower environmental toxicity to lubricants compared to mineral-based lubricants. Therefore, several strategies for biolubricant synthesis have been explored, including the use of biocatalysts. In this context, this study had two main objectives: i) to evaluate the production of fatty acids by enzymatic hydrolysis catalyzed by lipase from *Rhizomucor miehei*, targeting future applications; and ii) to evaluate the synthesis of biolubricants using free fatty acids (FFAs) obtained by chemical hydrolysis in combination with fusel oil, a waste product from the sugar and alcohol industry, as an alcoholic source. Initially, enzymatic hydrolysis studies of commercial soybean, canola, sunflower, and cottonseed oils were carried out by *R. miehei* lipase in its free form and immobilized on a magnetic support obtained from cashew apple bagasse lignin (Lig-Mag), for the production of free fatty acids. For this purpose, lignin was initially extracted from cashew apple bagasse, followed by the magnetization process and subsequent immobilization of the enzyme, evaluating two enzyme loads: 0.5 mg and 5 mg of protein per g of support, in which the obtained biocatalysts were named Lig-Mag_RML_0.5 and Lig-Mag_RML_5, respectively. In the hydrolysis tests, oil: water molar ratios of 1:1, 1:2, and 1:3 were evaluated at 50 °C, 150 rpm, for 24 h. As a result, it was observed that the highest hydrolysis percentages were obtained with cottonseed and canola oils, and the biocatalyst Lig-Mag_RML_5 presented the best performance, obtaining a hydrolysis percentage of $62.2 \pm 1.8\%$ for cottonseed oil and $53.4 \pm 1.4\%$ for canola oil. Subsequently, a study was carried out to evaluate the efficiency of the lipase B enzyme from *Candida antarctica*, in its free form and immobilized on the Lig-Mag support (Lig-Mag_CALB), in the esterification reaction using FFAs obtained by chemical hydrolysis and fusel oil as an alcohol mixture. The reactions occurred at acid: alcohol molar ratios of 1:1 and 1:3, at temperatures of 40 °C and 50 °C, for 48 h at 150 rpm. In the reactions conducted using Lig-Mag_CALB, the highest conversions were obtained with a 1:1 molar ratio and a temperature of 40 °C, reaching conversions of $72.4 \pm 1.3\%$ and $73.9 \pm 0.6\%$ using FFAs from cottonseed oil and canola oil, respectively. The biocatalyst showed satisfactory operational stability, reaching relative conversions of 66.8% with FFAs from cottonseed oil and 64.5% with FFAs from canola oil, after five evaluated cycles. Furthermore, when stored at 4 °C, it maintained 85% of its catalytic activity after 27 days. Both biolubricants obtained from canola

and cottonseed oils showed promising physicochemical properties, meeting the technical requirements for lubricant formulations. Therefore, enzymatic hydrolysis constitutes a viable alternative for obtaining free fatty acids, while transesterification presents itself as an efficient strategy for the synthesis of esters with lubricating properties. The use of residues such as fusel oil and cashew apple bagasse lignin contributes to the development of more sustainable processes, with the potential to generate biodegradable, non-toxic products and add value to industry by-products.

Keywords: Vegetable oils; fusel oil; lignin; lipases; biolubrificant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	-	Moléculas dos óleos minerais.....	23
Figura 2.2	-	Complexo de propeptídeos lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (RML) - Código PDB 3TGL.....	29
Figura 2.3	-	Formação da reação de esterificação.....	30
Figura 2.4	-	Reação de hidroesterificação.....	31
Figura 2.5	-	Óleo fúsel.....	36
Figura 2.6	-	Estrutura cristalina da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) – Código PDB 1TCA, 1TCB, 1TCC.....	38
Figura 2.7	-	Lignina magnetizada (A) em comparação com a imobilização da lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB) em suporte magnético (B).....	41
Figura 3.1	-	Compósito Lig-Mag com ação magnética.....	53
Figura 3.2	-	Porcentagem de hidrólise obtidos nas reações usando óleo de canola (A) soja (B), girassol (C) e algodão (D), catalisadas por RML na forma livre, a diferentes razões volumétricas óleo: água de 1:1 (■); 1:2 (●) e 1:3 (▲). Temperatura de 50 °C, 150 rpm e 0,05 mg de proteínas por g de óleo. As linhas representam uma linha de tendência.....	55
Figura 3.3	-	Comparação entre a hidrólise catalisada pela enzima na forma livre (EL) e imobilizada (Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5) com a hidrólise química (HQ) para obtenção de ácidos graxos livres usando o óleo de algodão (A), canola (B), girassol (C) e soja (D). Condições: Temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm e tempo de reação de 24 h.....	58
Figura 4.1	-	Perfis de conversão de ésteres a partir do óleo da semente de algodão e álcool (óleo fusel) a 40 °C (A) e 50 °C (B) sob diferentes proporções molares de ácido: álcool catalisadas por CALB livre (símbolos azuis, ■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3) e Lig-Mag_CALB (símbolos pretos, ■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3).....	80

Figura 4.2	- Perfis de conversão para reações de esterificação usando ácido do óleo de canola e álcool a 40 °C (A) e 50 °C (B) sob diferentes proporções molares de ácido: álcool catalisadas por CALB livre (símbolos azuis, (■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3) e Lig-Mag_CALB (símbolos pretos, (■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3).....	82
Figura 4.3	- Conversão ao longo de ciclos reacionais sucessivos utilizando o biocatalisador Lig-Mag_CALB, com ácidos graxos derivados de óleos de algodão (A) e canola (B), a 40 °C e uma razão molar ácido: álcool de 1:1, utilizando óleo fúsel como fonte de álcool.....	87
Figura 4.4	- Atividade catalítica relativa do biocatalisador Lig-Mag_CALB durante armazenamento a 4 °C.....	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	– Classificação dos óleos básicos.....	24
Tabela 2.2	– Principais ácidos graxos dos óleos vegetais e fórmula molecular.....	33
Tabela 3.1	– Parâmetros do processo de imobilização da lipase <i>Rhizomucor miehei</i> no compósito Lig-Mag. Imobilização com tampão fosfato de sódio 5 mM, pH 7, em um período de 24 h.....	54
Tabela 3.2	– Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de algodão. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química.....	61
Tabela 3.3	– Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de canola. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química.....	63
Tabela 3.4	– Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de soja. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química.....	64
Tabela 3.5	– Composição percentual de ácidos graxos livres derivados dos óleos de girassol. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química.....	65
Tabela 4.1	– Parâmetros de imobilização de CALB em suporte Lig-Mag.....	77
Tabela 4.2	– Composição percentual de ácidos graxos livres derivados dos óleos de algodão e canola.....	78
Tabela 4.3	– Influência das fontes de ácidos graxos livres (AGLs), das condições experimentais e da forma do biocatalisador (CALB livre ou imobilizado) na produção ésteres com o óleo fúsel por esterificação de ácidos graxos em sistemas sem solvente.....	85
Tabela 4.4	– Propriedades físico-químicas dos ésteres produzidos enzimaticamente usando AGLs de óleos da semente de algodão e canola e álcool fúsel sintético.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGLs	Ácidos graxos livres
ANP	Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASF	Álcool fúsel simulado
CAB	Bagaçõ de caju
CAL-B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CNAB	Companhia Nacional de Abastecimento
DAG	Diacilglicerol
FeCl ₃	Cloreto de ferro (III) hexaidratado
FeSO ₄	Sulfato de ferro (II) heptaidratado
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos polinucleares
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IV	Índice de viscosidade
KOH	Hidróxido de potássio
LIG-MAG	Lignina magnetizada
MAG	Monoacilglicerol
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
Na ₂ BDC	Tereftalato dissódico
p-NPB	p-nitrofenil butirato
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginose</i>
ÚNICA	União da Indústria de Cana-de- açúcar e Bioenergia

LISTA DE SÍMBOLOS

US\$	Dólar dos Estados Unidos
%	Porcentagem
°C	Graus celsius
XV	Século 15
mm ² /s	Milímetro quadrado por segundo
mM	Milimolar
rpm	Rotações por minuto
μL	Microlitro
mL	Mililitro
h	Hora
mol • L ⁻¹	Mol por litro
v/v	Volume por volume
p/v	Peso por volume
min	Minuto
g	Gramma
mg	Miligramma
L	Litro

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	19
1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Objetivos	22
1.1.1	<i>Objetivo geral</i>	22
1.1.2	<i>Objetivo específico</i>	22
2	CAPÍTULO 2	23
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	23
2.1	Lubrificantes	23
2.1.1	<i>Parâmetros físico-químicos</i>	25
2.1.1.1	<i>Viscosidade e índice de viscosidade</i>	25
2.1.1.2	<i>Estabilidade oxidativa</i>	25
2.1.1.3	<i>Índice de acidez</i>	26
2.1.1.4	<i>Ponto de fluidez</i>	26
2.2	Biolubrificantes	26
2.2.1	<i>Produção dos biolubrificantes</i>	27
2.2.1.2	<i>Hidrólise</i>	28
2.2.1.3	<i>Esterificação</i>	30
2.2.1.4	<i>Hidroesterificação</i>	31
2.2.2	<i>Matérias primas</i>	32
2.2.2.1	<i>Óleos vegetais</i>	32
2.2.2.1.1	<i>Óleo de girassol</i>	33
2.2.2.1.2	<i>Óleo de canola</i>	34
2.2.2.1.3	<i>Óleo de soja</i>	34
2.2.2.1.4	<i>Óleo de algodão</i>	35
2.2.2.1.5	<i>Óleo fúsel</i>	36
2.2.3	<i>Biocatalisadores</i>	37
2.2.3.1	<i>Lipases</i>	38
2.2.3.2	<i>Imobilização enzimática</i>	39
3	CAPÍTULO 3	42
3.1	Introdução	43
3.2	Metodologia	45
3.2.1	<i>Materiais</i>	45

3.2.2	<i>Método</i>	46
3.2.2.1	<i>Obtenção e síntese do compósito de lignina do CAB</i>	46
3.2.2.2	<i>Imobilização da lipase de R. miehei no Lig-Mag</i>	47
3.2.2.3	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	48
3.2.2.4	<i>Hidrólise enzimática dos óleos vegetais (canola, algodão, girassol e soja)</i>	50
3.2.2.5	<i>Hidrólise química dos óleos vegetais (canola, algodão, girassol e soja)</i>	51
3.2.2.6	<i>Preparação dos ácidos graxos obtidos da hidrólise química e enzimática para análise de cromatografia gasosa</i>	51
3.2.2.7	<i>Determinação da composição de ácidos graxos de óleos vegetais por cromatografia gasosa (CG)</i>	52
3.2.3	<i>Análise estatística</i>	52
3.3	Resultados e discussão	53
3.3.1	<i>Rendimento de extração da lignina e do compósito Lig-Mag</i>	53
3.3.2	<i>Imobilização da lipase RML no suporte Lig-Mag</i>	53
3.3.3	<i>Reação de hidrólise enzimática com a enzima livre e imobilizada</i>	55
3.3.3.1	<i>Ensaio com a enzima livre</i>	55
3.3.4	<i>Comparação da hidrólise enzimática e da hidrólise química</i>	57
3.3.5	<i>Comparação dos ácidos graxos formados na hidrólise enzimática e química</i>	60
3.4	Conclusão	67
4	CAPÍTULO 4	68
4.1	Introdução	69
4.2	Metodologia	72
4.2.1	<i>Materiais</i>	72
4.2.2	<i>Método</i>	72
4.2.2.1	<i>Extração da lignina do bagaço de caju</i>	72
4.2.2.2	<i>Preparação do compósito lignina-magnetita</i>	73
4.2.2.3	<i>Imobilização da lipase B de Candida antarctica em Lig-Mag e determinação da Atividade enzimática</i>	73
4.2.2.4	<i>Determinação da atividade enzimática</i>	74
4.2.2.5	<i>Hidrólise química de óleos vegetais e caracterização de ácidos graxos livres</i>	74
4.2.2.6	<i>Produção de lubrificantes de origem biológica por meio de reações de esterificação: avaliando a influência de parâmetros relevantes</i>	75

4.2.2.7	<i>Estabilidade operacional e de armazenamento do biocatalisador Lig-Mag_CALB.....</i>	76
4.2.2.8	<i>Separação parcial dos lubrificantes da base biológica resultantes.....</i>	77
4.2.2.9	<i>Caracterização dos biolubrificantes da base biológica resultantes.....</i>	77
4.3	Resultados e discussão.....	77
4.3.1	<i>Imobilização da lipase B de Candida antarctica em suporte Lig-Mag.....</i>	77
4.3.2	<i>Hidrólise química de óleos vegetais de canola e algodão.....</i>	77
4.3.3	<i>Influência da temperatura e da razão molar ácido: álcool na síntese de biolubrificantes.....</i>	79
4.3.4	<i>Estabilidade operacional e de armazenamento do biocatalisador Lig-Mag_CALB.....</i>	86
4.3.5	<i>Parâmetros físico-químicos de ácidos graxos e biolubrificantes.....</i>	89
4.4	Conclusão.....	92
5	CAPÍTULO 5.....	93
5	Conclusão geral.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

A escassez das reservas de petróleo e a preocupação com as mudanças climáticas têm impulsionado a busca por alternativas que reduzam a dependência desse recurso e contribuam para mitigar seus impactos ambientais (Nogales-Delgado, Martín e Ocaña, 2022; McNutt; He, 2016). Entre as alternativas, destacam-se os biolubrificantes, um óleo que desempenha a função de reduzir o desgaste entre superfícies deslizantes, de forma semelhante aos lubrificantes derivados do petróleo e que são produzidos a partir de matérias-primas renováveis e de base biológica, como óleos vegetais, gorduras animais, entre outros compostos (Attia *et al.*, 2020; Sousa *et al.*, 2023).

Os biolubrificantes apresentam benefícios ambientais importantes, uma vez que sua biodegradabilidade reduz os riscos de contaminação em casos de vazamentos ou descartes (Nogales-Delgado, Martín e Ocaña, 2022). Essa característica é especialmente relevante considerando que, de acordo com Barbera *et al.* (2022), cerca de 55% dos lubrificantes consumidos atualmente acabam sendo lançados no meio ambiente por derramamentos ou descarte inadequado, e aproximadamente 90% desses resíduos contaminam o solo e a água devido à toxicidade de seus componentes (Matos; Gonçalves Filho; Barbosa, 2025).

Os biolubrificantes podem ser produzidos por diferentes métodos, como epoxidação, transesterificação, esterificação, entre outros. Sendo este último um dos mais utilizados, empregando como matérias-primas ácidos de óleos vegetais e álcool (Chowdhury; Mitra; Biswas, 2012). Nesse contexto, os óleos vegetais destacam-se por apresentar propriedades que os tornam adequados para a produção de biolubrificantes, uma vez que sua composição influencia diretamente nas características desejáveis desses produtos. Cada tipo de óleo vegetal possui uma composição distinta de ácidos graxos, o que permite sua aplicação específica como lubrificante. Por exemplo, o óleo de canola é rico em ácido oleico, um ácido graxo que confere maior estabilidade oxidativa, favorecendo seu uso como biolubrificante (Biyouk *et al.*, 2020; Uppar, Dinesha e Kumar 2024). Assim, como os óleos de algodão e girassol, que são ricos em ácido linoleico, e a literatura destaca que a utilização desse ácido na forma de triéster contribui para a melhoria das propriedades tribológicas e de baixa temperatura (Abdullah *et al.*, 2016).

Embora tradicionalmente utilizados na alimentação, os óleos vegetais vêm sendo estudados para produção de biolubrificantes, como alternativa aos lubrificantes

derivados do petróleo. Monteiro *et al.* (2024) destacam que, apesar de o óleo de soja ser comumente utilizado na alimentação, ele pode ser uma matéria-prima viável para a produção de biolubrificantes, por causa da sua disponibilidade. Além disso, óleos vegetais, como o óleo soja de cozinha usado, também podem ser reaproveitados para esse fim, contribuindo para a valorização de resíduos e a promoção de alternativas mais sustentáveis aos lubrificantes convencionais (Júnior *et al.* 2024).

Além dos óleos vegetais, um resíduo industrial que vem despertando interesse é o óleo fúsel, um subproduto da indústria sucroalcooleira obtido durante o processo de destilação do etanol (Tebas *et al.*, 2020). Ele é composto principalmente por álcoois superiores, sendo o álcool isoamílico o seu componente majoritário (Marinho *et al.*, 2025). Devido a essa composição, o óleo fúsel tem se mostrado promissor para aplicações em reações de esterificação voltadas à produção de biolubrificantes.

A biocatálise também tem se destacado na produção de biolubrificantes, devido este processo oferecer diversas vantagens, como menor geração de resíduos, condições reacionais mais brandas e o aumento da eficiência energética, tornando-se uma abordagem sustentável e eficiente para síntese de biolubrificantes (Sousa *et al.*, 2023). Segundo Sousa *et al.* (2023), as lipases têm sido amplamente empregadas nesta síntese, devido à sua capacidade de catalisar a conversão de uma ampla variedade de substratos em produtos desejados.

As lipases são biocatalisadores de grande importância, pois atuam em diversas reações, como transesterificação, esterificação, hidrólise, entre outras transformações relevantes em processos bioquímicos e industriais (Vivek; Sandhia; Subramanian, 2022). Dentre as lipases comumente utilizadas na síntese de produtos de interesse industrial, destacam-se a lipase B de *Candida antarctica* (CALB) (Faria *et al.*, 2024).

Contudo, a utilização de enzimas em sua forma livre apresenta algumas limitações, como a suscetibilidade a variações de temperatura, pH, e são difíceis de serem removidas do meio reacional (Rafiee; Rezaee, 2021). Logo, protocolos de imobilização têm sido estudados como alternativa para superar estas limitações, incluindo pesquisas voltadas para avaliar a obtenção de diferentes suportes, com destaque para os obtidos por materiais de baixo custo que possibilitem obter biocatalisadores com eficiência catalítica e viabilidade econômica (Girão Neto *et al.*, 2023; Pacheco; Andrade; Paula, 2024).

Um suporte de imobilização que vem sendo estudado e tem apresentado resultados promissores é derivado da lignina do bagaço de caju, associada à magnetita

(óxidos de ferro). Essa combinação confere ao material propriedades magnéticas, permitindo sua fácil remoção do meio reacional por meio da aplicação de um campo magnético (ímã). Por essa razão, torna-se interessante avaliar seu desempenho em outras aplicações (Girão Neto *et al.*, 2023; Serpa *et al.*, 2021).

Diante disso, o objetivo deste trabalho foi produzir ácidos graxos livres (AGLs) por meio da hidrólise química e enzimática (utilizando enzima livre e imobilizada em suporte magnético produzido com a lignina do bagaço de caju) e a obtenção de biolubrificantes por meio da reação de hidroesterificação, empregando biocatalisador também magnético. Para isso, o estudo foi dividido em capítulos. O **Capítulo 1** é este que já apresenta a introdução ao tema da pesquisa, contextualizando o problema e delineando os objetivos do estudo. O **Capítulo 2** corresponde ao referencial teórico, abordando os principais conceitos relacionados aos biolubrificantes, biocatálise, reação de esterificação e hidroesterificação. O **Capítulo 3** trata do estudo da hidrólise enzimática para obtenção de ácidos graxos livres, utilizando a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), na sua forma livre e imobilizada em um suporte magnético obtido a partir da lignina do bagaço de caju (Lig-Mag), com o intuito de viabilizar a produção de biolubrificantes. O **Capítulo 4** aborda a síntese dos biolubrificantes a partir dos ácidos graxos livres provenientes da hidrólise química dos óleos de algodão e canola. Neste processo, a reação de esterificação foi catalisada por lipase B de *Candida antarctica* (CALB), na sua forma livre e imobilizada em suporte magnético produzido a partir da lignina do bagaço de caju (Lig-Mag), e o **Capítulo 5** apresenta a conclusão do trabalho.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar biolubrificantes utilizando os ácidos graxos de óleos vegetais e óleo fúsel como fonte de álcool por meio do uso de biocatalisadores de lipase imobilizada em compósito de lignina do bagaço de caju, em um meio reacional livre de solvente.

1.1.2 Objetivos específicos

- I. Extrair a lignina do bagaço de caju e produzir compósito de lignina com magnetita (óxidos de ferro);
- II. Produzir biocatalisadores magnéticos com a lipase B de *Candida antarctica* e a lipase de *Rhizomucor miehei*;
- III. Avaliar a hidrólise dos óleos vegetais de canola, algodão, soja e girassol, utilizando biocatalisadores enzimáticos e comparar os resultados com a hidrólise química;
- IV. Verificar, por cromatografia gasosa, os ácidos graxos formados na hidrólise enzimática e comparar os resultados com a hidrólise química;
- V. Avaliar a síntese de ésteres com ação lubrificante usando os ácidos graxos livres dos óleos de maior desempenho, obtidos por hidrólise química;
- VI. Analisar a viscosidade, o índice de viscosidade e o estado de oxidação dos biolubrificantes sintetizados;
- VII. Avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador produzido com a lipase B de *Candida antarctica*, bem como seu armazenamento depois da produção inicial.

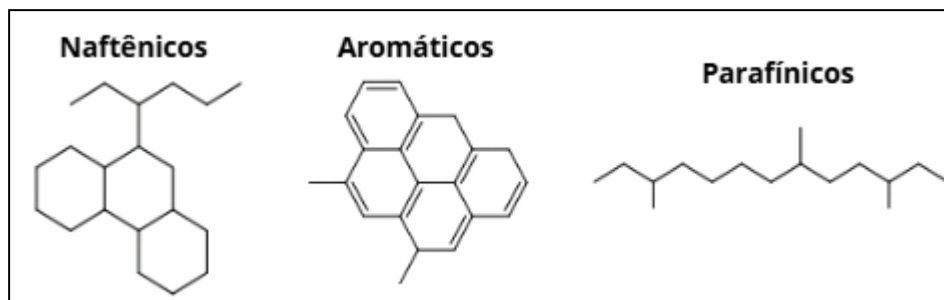
CAPÍTULO 2

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Lubrificantes

Os lubrificantes são hidrocarbonetos derivados do refino do petróleo e classificam-se em naftênicos, aromáticos e parafínicos. Sua principal função na indústria é reduzir o atrito entre superfícies deslizantes, formando uma película protetora. Podem ser de origem natural, mineral ou sintética, sendo que, devido ao menor custo de produção, os lubrificantes minerais são os mais utilizados (Silva, 2024). Figura 2.1 mostra exemplos de moléculas dos óleos minerais.

Figura 2.1- Moléculas dos óleos minerais



Fonte: Silva (2024, com adaptações).

Com base na Agência Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) (Brasil, 2019), os lubrificantes são compostos a partir de óleo básico ou de uma mistura de óleos básicos, podendo conter aditivos conforme a necessidade de sua aplicação. Segundo a Resolução ANP nº 804/2019, os óleos básicos são classificados em seis grupos, com base em características específicas como a estrutura química, o teor de compostos saturados, o teor de enxofre e o índice de viscosidade. Conforme Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Classificação dos óleos básicos

Grupo	Origem	Teor de saturados (%)	Teor de enxofre (%)	Índice de viscosidade
I	Mineral	< 90	> 0,03	80 – 120
II	Mineral	≥ 90	≤ 0,03	80 – 120
III	Mineral	≥ 90	≤ 0,03	≥ 120
	(Hidrocrackeamento)			
IV	Sintético	-	-	-
V	Sintético	-	-	-
VI	Biobaseado	Variável	Variável	Variável

* Biobaseado – Inclui óleo de base renovável (biomassa renovável).

Fonte: Brasil (adaptada da Resolução ANP n° 804/2019).

De acordo com Fortune Business Insights (2025), o mercado global de lubrificantes automotivos deve crescer de US\$ 71,42 bilhões para US\$ 80,35 bilhões em 2032. Dados que representam uma parcela significativa da produção de óleo lubrificante, contudo, estima-se que cerca de 50% dos lubrificantes utilizados no mundo são descartados de forma inadequada (Silva, 2024).

Segundo Pinheiro, Quina e Gando-Ferreira (2020), o descarte inadequado de óleos lubrificantes usados representa uma ameaça significativa ao meio ambiente, principalmente devido à presença de hidrocarbonetos, metais pesados e aditivos tóxicos. Quando descartados de forma incorreta, como no solo, na rede de esgoto ou em corpos d'água, esses resíduos podem contaminar o solo e a água, afetar a fauna e a flora, e causar impactos à saúde humana por bioacumulação (Parekh, Gaur e Shahabuddin 2024).

Portanto, há uma crescente motivação para o desenvolvimento de métodos sustentáveis que reduzam o uso de lubrificantes de origem mineral, mas que, ao mesmo tempo, mantenham propriedades comparáveis às dos lubrificantes convencionais. Esses produtos são amplamente utilizados em aplicações industriais, como óleos de compressor, óleos hidráulicos e óleos de transmissão, desempenhando funções essenciais, como a redução do desgaste entre superfícies, a dissipação de calor e o aumento da eficiência dos equipamentos (Hamnas; Unnikrishnan, 2023). Nesse contexto, o desenvolvimento de biolubrificantes que preservem essas propriedades funcionais dos lubrificantes, mas com menor impacto ambiental, vem sendo amplamente estudado.

Para atender às exigências da resolução, os lubrificantes devem ter suas propriedades físico-químicas avaliadas e classificadas de acordo com a norma em vigor. Logo, ambos, os lubrificantes e biolubrificantes, precisam exibir propriedades físico-químicas adequadas.

2.1.1 Parâmetros físico-químicos

2.1.1.1 Viscosidade e índice de viscosidade

A viscosidade é compreendida como a resistência de um fluido ao cisalhamento, variando diretamente com a pressão e inversamente com a temperatura de forma não linear. Assim, à medida que a temperatura do líquido aumenta, a viscosidade diminui, e quando a temperatura diminui, a viscosidade aumenta (Santos, 2024). Segundo Sousa *et al.* (2023), a viscosidade é um dos principais parâmetros dos biolubrificantes e devido às interações intermoleculares é possível descrever o atrito interno dentro de um líquido.

Nesse contexto, um lubrificante deve apresentar viscosidade suficiente para manter a película protetora entre as peças, sem ser excessivamente viscoso a ponto de comprometer a movimentação do maquinário, sendo uma característica fundamental na escolha do lubrificante adequado (Santos, 2024).

A viscosidade pode ser avaliada por meio de diferentes parâmetros, como a viscosidade dinâmica e a viscosidade cinemática a 40 °C e a 100 °C. A partir dos valores de viscosidade cinemática nessas temperaturas, é possível determinar o índice de viscosidade, um indicador importante da estabilidade da viscosidade em diferentes condições térmicas, pois quanto maior o índice de viscosidade, menor a influência da elevação da temperatura sobre a viscosidade (Albaiti *et al.*, 2017; Santos, 2024). Essas informações permitem identificar as características físico-químicas de cada biolubrificante produzido, contribuindo para a avaliação de seu desempenho em diferentes condições operacionais (Santos, 2024).

2.1.1.2 Estabilidade oxidativa

Os biolubrificantes produzidos a partir de ácidos graxos de óleos vegetais podem ser propensos a degradação oxidativa, devido a esses ácidos apresentarem

insaturações na cadeia carbônica (Mendes; Soares; Tardioli, 2022). Esses são os pontos mais vulneráveis da molécula, pois são altamente reativos e facilitam a adição de grupos funcionais (Nor; Salih; Salimon, 2021).

De fato, com base na composição dos ácidos graxos da matéria-prima utilizada na produção de biolubrificantes, pode ocorrer uma diminuição na estabilidade à oxidação. Isso se deve ao fato de que óleos com alto teor de ácido oleico e linoleico, assim como a presença de biocatalisadores no produto, podem reduzir a estabilidade do composto (Nogales-Delgado *et al.*, 2022). Portanto, é fundamental estudar a degradação oxidativa dos ésteres formados para determinar sua vida útil, assim como identificar os melhores biolubrificantes.

2.1.1.3 Índice de acidez

O índice de acidez é utilizado para avaliar o grau de decomposição de óleos ou gorduras, servindo como um indicador da qualidade do produto. A acidez resulta da hidrólise parcial dos triglicerídeos, sendo determinada pela quantidade de hidróxido de sódio ou potássio necessária para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em um grama da amostra (Cavalcante *et al.*, 2016).

Um índice de acidez elevado indica degradação significativa da matéria-prima, o que pode comprometer a eficiência do produto, especialmente em aplicações de alta exigência, assim como uma elevada acidez influencia a corrosão dos equipamentos (Silva, 2011). Portanto, sua determinação é essencial para garantir a estabilidade e o desempenho do biolubrificante ao longo do tempo.

2.1.1.4 Ponto de fluidez

O ponto de fluidez corresponde à temperatura mínima na qual o lubrificante ainda mantém a capacidade de escoar. Abaixo desse limite, o lubrificante perde a fluidez, o que compromete seu desempenho, especialmente em regiões de clima muito frio, onde pode deixar de exercer sua função adequadamente (Oliveira, 2013).

2.2 Biolubrificantes

Os biolubrificantes são lubrificantes geralmente obtidos de óleos vegetais ou gorduras animais, mas podem ser também produzidos com ésteres sintéticos (Hamnas; Unnikrishnan, 2023). Entre os óleos vegetais, destacam-se aqueles extraídos das sementes de girassol, soja, coco, palma, entre outros (Khan *et al.*, 2022).

Apesar de apresentarem benefícios ambientais significativos, esses materiais de origem renovável também conferem aos biolubrificantes algumas limitações, como baixa estabilidade à oxidação térmica, tendência à solidificação em temperaturas reduzidas (devido aos altos pontos de fluidez), susceptibilidade à deterioração biológica e instabilidade hidrolítica (Reeves; Siddaiah; Menezes, 2017; Khan *et al.*, 2022).

Ainda assim, os biolubrificantes se destacam por diversas propriedades favoráveis, como alta biodegradabilidade, elevado índice de viscosidade, propriedades anticorrosivas, além disso possuem menor coeficiente de atrito em comparação aos lubrificantes derivados do petróleo (Matos; Gonçalves Filho; Barbosa, 2025).

Com o avanço das preocupações ambientais e a busca por alternativas mais sustentáveis aos lubrificantes minerais, o mercado de biolubrificantes tem apresentado crescimento significativo. Segundo Global Risk Community (2021), a demanda global por esses produtos em 2020 foi de 4,32 milhões de toneladas, com previsão de crescimento anual de 3,45%, podendo atingir 6,06 milhões de toneladas até 2030. Corroborando essa tendência, estimativas da Fortune Business Insights (2025) indicam que o mercado poderá alcançar US\$ 4,90 bilhões até 2032. Diante desse cenário promissor, intensificar as pesquisas na área torna-se essencial, especialmente em setores como o de transportes, que exigem lubrificantes comerciais com melhor desempenho, maior vida útil e conformidade com normas ambientais (Matos; Gonçalves Filho; Barbosa, 2025).

2.2.1 Produção dos biolubrificantes

Os biolubrificantes geralmente são obtidos por meio de reações químicas como transesterificação, epoxidação, hidrogenação ou hidroesterificação. A transesterificação, por exemplo, envolve a reação dos triglicerídeos presentes nos óleos vegetais com mono ou polióis (Sabi *et al.*, 2022). A reação de epoxidação consiste na oxidação de ligações duplas presentes em ácidos graxos insaturados, resultando na formação de um anel de oxirano (Abdullah *et al.*, 2016). Já a reação de hidrogenação é empregada para reduzir ou saturar compostos orgânicos, geralmente na presença de

catalisadores metálicos como paládio, níquel ou platina (Uppar; Dinesha; Kumar, 2022). A reação de esterificação ocorre por meio da reação entre ácidos e álcoois. De forma semelhante, a hidroesterificação também envolve a utilização de ácidos e álcoois e permite o uso de qualquer matéria-prima graxa (óleos de fritura, borras ácidas, gordura animal, entre outros), sendo realizada em duas etapas, uma de hidrólise e a outra de esterificação (Santos *et al.*, 2015).

No presente estudo a reação utilizada foi a de hidroesterificação.

2.2.1.1 Hidrólise

Os ácidos graxos livres obtidos a partir de óleos vegetais podem ser gerados por processos de hidrólise, como a hidrólise química ou a hidrólise enzimática. No caso da hidrólise química, são utilizados catalisadores que são bases fortes como hidróxido de potássio (KOH) ou hidróxido de sódio (NaOH), sendo um método caro, que requer uma etapa de acidificação da amostra utilizando o ácido clorídrico (HCl) ou o ácido sulfúrico (H₂SO₄), que atuam sob condições específicas de temperatura e pressão para favorecer a liberação dos AGLs (Nitbani *et al.*, 2020). Nitbani *et al.*, (2020), em seu estudo, cita a hidrólise do óleo de milho e palma à temperatura ambiente, com um tempo de reação de 90 min, utilizando o catalisador de KOH 11% (m/v) e solvente etanol.

Na hidrólise enzimática, a reação ocorre na presença da água, o óleo vegetal e o catalisador enzimático. O processo ocorre em temperaturas ambientes e pressões atmosféricas, sendo uma reação de baixo consumo de energia, o que pode ser considerada uma reação que atende aos critérios da química verde (Nitbani *et al.*, 2020). Para esse tipo de reação, as lipases têm sido amplamente estudadas e demonstrado boa eficácia (conforme descrito no Tópico 2.2.3.1). A hidrólise enzimática com lipases é viável porque essa reação ocorre na interface entre a fase oleosa e a fase aquosa, onde a enzima atua (Nitbani *et al.*, 2020; Mhadmhan; Yoosuk; Henpraserttae, 2024).

As lipases apresentam comportamento interfacial, ou seja, possuem duas conformações estruturais: uma forma fechada e inativa, presente em meio aquoso, e uma forma aberta e ativa, que se manifesta quando a enzima entra em contato com uma superfície hidrofóbica, como a de um óleo. Essa mudança conformacional expõe o sítio ativo da enzima, levando ao aumento de sua atividade catalítica (Mhadmhan; Yoosuk; Henpraserttae, 2024). Esse mecanismo é essencial para a hidrólise eficiente de gorduras e óleos, pois permite a produção de ácidos graxos livres com qualidade satisfatória,

adequados para diversas aplicações industriais (Nitbani *et al.*, 2020). Várias lipases têm sido estudadas em reações de hidrólise, destacando-se, entre elas, a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), a lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e a lipase de *Rhizomucor miehei* (RML). Esta última, representada na Figura 2.2, tem demonstrado elevada eficiência na hidrólise de óleos vegetais. Em pesquisa conduzida por Souza *et al.* (2020), que avaliou um coquetel enzimático para a hidrólise do óleo de coco assistida por ultrassom, a lipase de *Rhizomucor miehei* destacou-se como a enzima com a maior taxa de conversão quando analisada isoladamente com conversão de 33,66%.

Figura 2.2 - Complexo propeptídeos lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) - Código PDB 3TGL



Fonte: Protein Data Bank, 2019.

Os ácidos graxos livres podem ser utilizados como matéria-prima na produção de diversos compostos como, álcoois, aminas, entre outros (Souza *et al.*, 2020). Entre as aplicações de destaque está a produção de biolubrificantes, na qual os ácidos graxos obtidos por hidrólise enzimática são posteriormente submetidos a uma reação de esterificação com álcoois. A integração dessas duas etapas, hidrólise seguida de esterificação é conhecida como hidroesterificação.

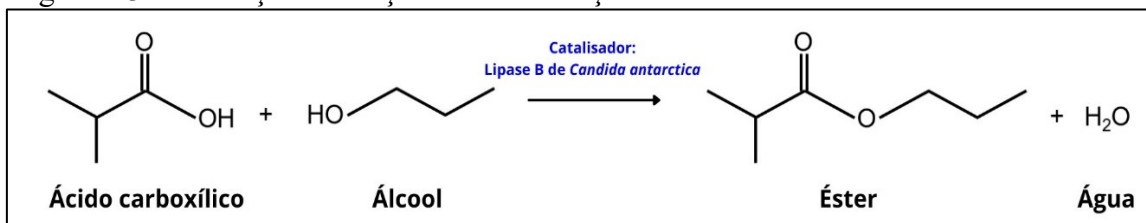
Guimarães *et al.* (2024) realizaram esse processo utilizando óleo de soja, seguido de esterificação com álcool octílico, obtendo uma conversão de 94% após 3 h de reação em um reator de fluxo de vórtice. Chowdhury, Mitra e Biswas (2012), realizaram a síntese de biolubrificantes utilizando óleo de cozinha usado. Na etapa de hidrólise, utilizou-se a enzima lipase de *C. rugosa*, e os ácidos obtidos foram postos em reação de

esterificação com catalisador químico Amberlyst 15H e álcool octanol, resultando na produção de ésteres de octila. Os autores relataram este processo como uma abordagem viável para a produção de biolubrificantes.

2.2.1.2 Esterificação

A reação de esterificação baseia-se na utilização de um álcool e um ácido carboxílico para obtenção de ésteres, os quais podem ter ação lubrificante, podendo ocorrer na presença de um catalisador básico, ácido ou enzimático. Uma diferença importante entre os catalisadores químicos (ácidos ou bases) e os catalisadores enzimáticos está nos impactos operacionais e ambientais. Por exemplo, a catálise básica geralmente requer altas temperaturas, apresenta alto consumo energético, e pode gerar resíduos prejudiciais ao meio ambiente (Silva, 2019). Em contrapartida, os catalisadores enzimáticos oferecem uma alternativa mais sustentável e seletiva, operando sob condições mais brandas (Barbosa *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2023). A Figura 2.3 apresenta a reação de esterificação e cita, como exemplo, o nome de um biocatalisador.

Figura 2.3 - Formação da reação de esterificação



Fonte: Elaborada pela autora.

A reação de esterificação utiliza ácidos graxos livres (AGLs) e álcool como reagentes, diferindo da transesterificação, que emprega triglicerídeos como substrato, embora também envolva álcool. Outra diferença relevante é que, na esterificação, o subproduto gerado é a água. Isso contrasta com outras rotas químicas, como a transesterificação, em que podem ser formados subprodutos como o glicerol (Barros *et al.*, 2012).

Neste trabalho, a fonte de álcool utilizada é o óleo fúsel, uma mistura composta por diferentes tipos de álcoois. Já os ácidos graxos, também denominados ácidos carboxílicos, empregados na reação de esterificação para a produção de

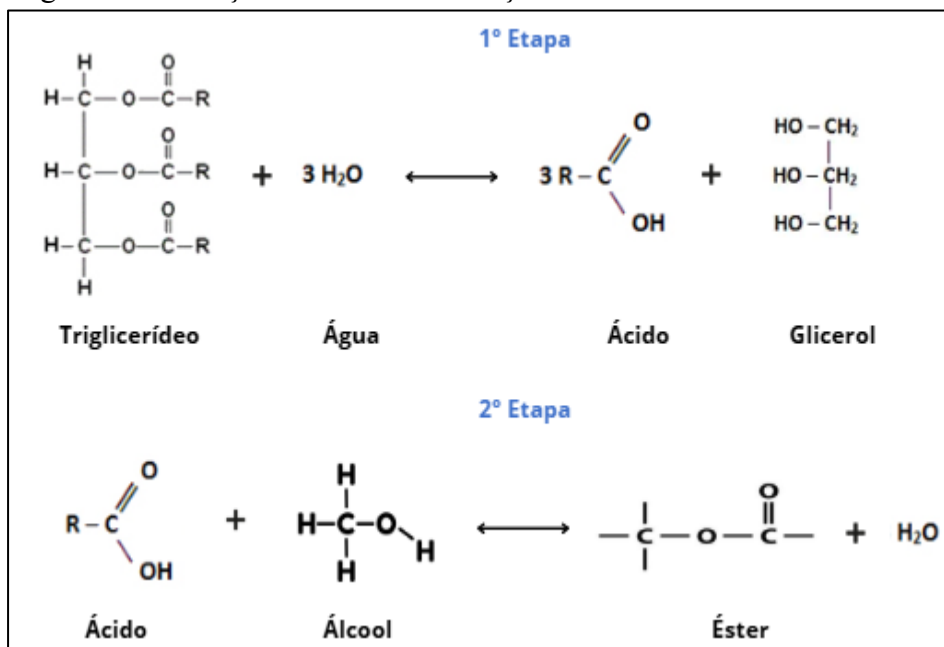
biolubrificantes, são obtidos a partir de óleos vegetais, por meio de hidrólise química ou enzimática.

Estudos anteriores demonstram a viabilidade dessa rota. Por exemplo, Serpa *et al.* (2021), utilizaram a esterificação para a produção de oleato de etila e oleato de 2-etil-hexil, empregando um biocatalisador magnético, e obtiveram conversões de 88,2% e 76,7%, respectivamente. Montiel *et al.*, (2024) também empregaram a reação de esterificação, mas utilizaram o ácido 2-metilhexanoico com o álcool 2-octil-1-dodecanol, catalisados pela enzima Lipozyme 435, obtendo um éster com elevado índice de viscosidade.

2.2.1.3 Hidroesterificação

A reação de hidroesterificação ocorre em duas etapas. Na primeira etapa, o triglicerídeo reage com água, na presença ou ausência de um catalisador, resultando na liberação de ácidos graxos livres e glicerol. Na segunda etapa, esses ácidos graxos reagem com um álcool, resultando na formação de ésteres e água (Domingues *et al.*, 2022). A Figura 2.4 mostra a reação de hidroesterificação.

Figura 2.4 – Reação de hidroesterificação



Fonte: Elaborado pela autora.

Neste contexto, a hidroesterificação é uma estratégia que permite utilizar a enzima em ambas as etapas, tanto na hidrólise, quanto na esterificação. O processo utiliza matérias-primas renováveis, como gorduras e óleos de origem vegetal, apresentando como vantagem a não formação de compostos indesejáveis, como os sabões (Hong; Kim; Kim, 2023). Entretanto, uma limitação importante desse processo é a presença de água remanescente da etapa de hidrólise, que pode favorecer a reação reversa durante a esterificação dos ácidos graxos, reduzindo a conversão dos ésteres (Guimarães *et al.*, 2024).

Guimarães *et al.* (2024) desenvolveram um processo de hidroesterificação para a produção de ésteres de octila a partir de óleo de soja degomado, utilizando lipases nas formas livre e imobilizada. Na etapa de hidrólise, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* resultou em uma conversão de 97% após 23 h de reação. Já na etapa de esterificação, a enzima Eversa® Transform 2.0, imobilizada em Purolite Lifetech, alcançou um rendimento de 87%. Esses resultados demonstram a eficácia do processo de hidroesterificação, tanto na conversão dos triglicerídeos em ácidos graxos livres quanto na subsequente formação dos ésteres.

2.2.2 Matéria primas

2.2.2.1 Óleos vegetais

Os óleos vegetais são substâncias que pertencem à classe dos lipídeos, formados pela mistura de vários ácidos graxos. Esses ácidos são encontrados ligados na forma de ésteres de glicerina, podendo formar monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e triacilgliceróis (Ramalho; Suarez, 2013).

Os triglicerídeos, presentes nos óleos vegetais, contêm ácidos graxos que apresentam ligações duplas (insaturações), as quais influenciam suas propriedades físico-químicas. Quanto maior a quantidade de insaturações, menor será o ponto de fusão e ebulição. Por outro lado, quanto menor for o número de insaturações, maior será a tendência desses ácidos graxos se solidificarem à temperatura ambiente (Ramalho; Suarez, 2013).

A composição dos ácidos graxos nos óleos vegetais varia de acordo com o tipo de óleo. Os ácidos graxos dos óleos vegetais geralmente são formados por ácidos como oleico, linoleico, linolênico, palmítico, entre outros (Tian *et al.*, 2023). Em alguns

casos, essa variação apresenta benefícios, como nos óleos ricos em ácido oleico, cujo alto teor melhora a estabilidade oxidativa durante o armazenamento (Encimar; Nogales; González, 2020). A fórmula molecular dos principais ácidos graxos pode ser observada na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Principais ácidos graxos dos óleos vegetais e fórmula molecular

Ácido Graxo	Fórmula Molecular
Palmítico (C16:0)	$C_{16}H_{32}O_2$
Estearico (C18:0)	$C_{18}H_{36}O_2$
Oleico (C18:1)	$C_{18}H_{34}O_2$
Linoleico (C18:2)	$C_{18}H_{32}O_2$
Linolênico (C18:3)	$C_{18}H_{30}O_2$

Fonte: Tian (2023, com adaptações).

Esta pesquisa irá analisar os óleos vegetais de girassol, canola, soja e algodão, com o objetivo de avaliar o desempenho destes na síntese de ésteres com propriedades lubrificantes e, assim, identificar quais apresentam as melhores características, considerando que são óleos ricos em ácidos graxos com propriedades favoráveis para essa aplicação. Apesar de concorrerem com a indústria alimentícia, esses óleos apresentam elevada disponibilidade, o que viabiliza seu uso (valores de produção de cada óleo serão reportados nos tópicos 2.2.2.1.1, 2.2.2.1.2, 2.2.2.1.3 e 2.2.2.1.4).

2.2.2.1.1 Óleo de girassol

O girassol (*Helianthus annuus*) é uma planta nativa do oeste da América do Norte e uma das culturas mais relevantes globalmente. No Brasil, o cultivo do girassol teve início na região Sul (Castiglioni, 1997). Na safra de 2024/2025, o estado de Goiás se destaca como principal produtor, respondendo por 71,6% da produção nacional, o que corresponde a cerca de 71 mil toneladas, conforme dados base nos dados do 6º Levantamento da safra 2024/2025 da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB).

Segundo Pedroso (2020), o óleo de girassol possui um elevado teor de ácidos graxos insaturados e compostos tocoferólicos. É um óleo rico em ácido oleico e ácido linoleico, dois ácidos graxos essenciais. O ácido oleico contribui para o aumento da

lubricidade e a redução do ponto de fusão, melhorando as propriedades do óleo lubrificante em diversas aplicações (Khan *et al.*, 2022). Diante disso, seu uso na produção de biolubrificantes surge como uma alternativa viável, devido aos compostos presentes em sua composição apresentarem potencial.

O óleo de girassol residual, proveniente de fritura, foi investigado como matéria-prima para a produção de biolubrificantes por meio de catálise química, utilizando hidróxido de potássio, hidróxido de magnésio entre outros. Os resultados obtidos demonstraram desempenho satisfatório no processo de síntese do biolubrificante (Mohamed; Gülten; Mustafa, 2023).

2.2.2.1.2 Óleo de canola

As cultivares com baixo teor de ácido erúico e glucosinolatos foram denominadas de canola (*Brassica napus*) na América do Norte, diferenciando-as da colza industrial, que contém níveis elevados desses compostos (So; Duncan, 2021). As culturas de canola se expandiram em diversos países e regiões, com destaque para a União Europeia, China, Brasil, Austrália e Polônia (Nelson *et al.*, 2022). No Brasil, com base nos dados da CONAB com o 5º Levantamento safra 2024/2025 a estimava da produção de grãos é de 203,6 mil toneladas.

Os principais ácidos graxos presentes no óleo de canola são o ácido oleico, linolênico, linoleico, esteárico e palmítico. Esse óleo vegetal possui coloração amarelada, além de um odor e sabor característicos e é amplamente utilizado na indústria alimentícia e também estudado para o desenvolvimento de combustíveis renováveis (Biyouk *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2024).

Segundo Uppar, Dinesha e Kumar (2024), óleos vegetais com alto teor de ácido oleico apresentam grande potencial para a produção de biolubrificantes, podendo substituir os lubrificantes convencionais. Isso se deve às características favoráveis do ácido, como boa estabilidade oxidativa e biodegradabilidade (Biyouk *et al.*, 2020).

2.2.2.1.3 Óleo de soja

A soja (*Glycine max L*) foi introduzida na Europa no final do século XV. Já no Brasil, a produção de soja teve início no final da década de 1960 (Embrapa, 2025). De acordo com o 2º Levantamento safra 2023/2024 da CONAB, a soja tem sido utilizada na

produção de farinha, emulsificantes e óleo vegetal destinado à indústria alimentícia. No 5º Levantamento safra 2024/2025, divulgada em 13 de fevereiro pela CONAB a produção de soja no Brasil é estimada em 166 milhões de toneladas.

O óleo de soja apresenta alto teor de ácido linoleico e ácido oleico, sendo o ácido linoleico um ácido graxo poli-insaturado essencial. Além disso, contém quantidades menores de ácido palmítico, esteárico e linolênico (Silva *et al.*, 2021). Apresenta excelente lubricidade, o que o torna ideal para reduzir o atrito em superfícies metálicas. No entanto, sua baixa estabilidade oxidativa o torna suscetível à degradação com o tempo. Todavia, possui um elevado índice de viscosidade, garantindo estabilidade em diferentes temperaturas, e baixos pontos de fluidez, o que favorece sua utilização em ambientes frios (Khan *et al.*, 2022). Nesse contexto, a utilização do óleo de soja para produção de biolubrificantes representa uma alternativa interessante.

2.2.2.1.4 Óleo de algodão

O algodoeiro (*Gossypium hirsutum*) é uma espécie de grande relevância para a indústria devido às suas diversas aplicações e ao seu total aproveitamento. A produção mundial representa cerca de 90% do algodão em caroço ou rama. Além de ser uma planta fibrosa, também possui características oleaginosas. No processo de separação da fibra, um dos principais subprodutos é o óleo, amplamente utilizado na indústria alimentícia (Ramos, 2024). Com base no 5º Levantamento da safra de grão 2024/2025 da CONAB a produção de algodão em pluma foi de 3,8 mil toneladas, com um crescimento de 3,3% no de cultivo de algodão.

A produção de algodão é incentivada por sua viabilidade econômica para pequenas propriedades rurais, sendo o óleo extraído destinado a fins energéticos, indústria alimentícia, dentre outros (Ramos, 2024).

O óleo da semente de algodão é composto por uma mistura de ácidos graxos insaturados e saturados, contendo aproximadamente 52,8% de ácido linoleico (poli-insaturado), 25,5% de ácido palmítico (saturado), 16,4% de ácido oleico (monoinsaturado), além de menores proporções de ácidos esteárico e butírico (Kaur *et al.*, 2025). O ácido oleico é valorizado por sua estabilidade térmica, sendo ideal para aplicações que exigem resistência ao calor. Já os ácidos esteárico e palmítico, por serem saturados, estão associados a menor valor nutricional. Em contrapartida, o ácido linoleico

é considerado uma opção mais saudável por ser essencial à dieta humana (Kaur *et al.*, 2025).

Gul *et al.* (2020) realizaram a síntese de um biolubrificante a partir do óleo da semente de algodão, que foi adicionado a lubrificantes comerciais para avaliação de suas propriedades tribológicas. Os autores observaram que a adição de 10% do biolubrificante atuou como aditivo, podendo reduzir a dependência de derivados do petróleo.

Nesse contexto, o uso do óleo de algodão na produção de biolubrificantes surge como uma alternativa promissora, pois, além de beneficiar propriedades rurais, também contribui para a produção de biolubrificantes ambientalmente sustentável e que podem reduzir a dependência do petróleo.

2.2.2.1.5 Óleo fúsel (fonte de álcool)

O óleo fúsel, cujo aparência visual está demonstrada na Figura 2.5, é um subproduto da indústria sucroalcooleira. Esse resíduo é gerado na coluna de destilação durante o processo de produção do álcool. Sua composição varia conforme a matéria-prima utilizada e as condições de fermentação (Tebas *et al.*, 2020). Possui coloração marrom e um odor acentuado (Mendoza-Pedroza *et al.*, 2021). Embora o óleo fúsel não interfira diretamente nos custos de produção do etanol, sua valorização como insumo alternativo representa um avanço em termos de eficiência energética e sustentabilidade para a indústria (Bôas *et al.*, 2021).

Figura 2.5 – Óleo fúsel



Fonte: Elaborada pela autora.

O óleo fúsel é composto por uma mistura complexa de álcoois superiores, entre os quais se destacam o álcool isoamílico, isobutanol, propanol, n-butanol e hexanol. Dentre esses, o álcool isoamílico é o componente majoritário, representando aproximadamente 60 a 70% da composição da mistura (Marinho *et al.*, 2025). Devido a essa composição, o óleo fúsel se apresenta como uma alternativa promissora para ser aplicado em reações de esterificação, transesterificação, possibilitando a obtenção de uma ampla variedade de ésteres de interesse industrial (Bôas *et al.*, 2021; Marinho *et al.*, 2025). Neste contexto, Bôas *et al.*, (2021) sintetizaram o oleato de isoamila, um biolubrificante obtido a partir do óleo fúsel e ácido oleico, e verificaram que as amostras purificadas atenderam aos requisitos estabelecidos para biolubrificantes.

Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar e Bioenergia (UNICA), na safra 2023/2024, o Brasil produziu 35,9 bilhões de litros de etanol. Atualmente, a produção de etanol está em crescimento, e estima-se que o mercado alcance US\$ 64,8 bilhões em 2025 (Mendoza-Pedroza *et al.*, 2021). De acordo com Pérez *et al.*, (2001), a quantidade média de óleo fúsel produzido é estimada em 2,5 L para cada 1000 L de etanol, representando um valor considerável produzido, que geralmente não possui uma destinação específica. Dessa forma, a utilização desse resíduo para fabricação de produtos de maior valor agregado, como biolubrificantes, demonstra um grande potencial.

Estevez *et al.* (2024) investigaram o uso do óleo fúsel como solvente de baixa viscosidade e baixo teor de cetano em combinação com óleo de mamona ou óleo de girassol para aplicação em biocombustíveis. Os resultados obtidos apresentaram características comparáveis às do diesel fóssil.

O óleo fúsel também foi empregado na síntese de biolubrificantes utilizando o óleo de soja usado, em uma reação catalisada pela lipase Eversa® Transform 2.0 (ET 2.0) para a produção de ésteres monoalquílicos epoxidados, obtendo resultados promissores quanto à conversão e estabilidade dos produtos obtidos (Mattos *et al.*, 2023). Esses dados reforçam a relevância desta pesquisa, uma vez que, os biolubrificantes testados podem apresentar características que se assemelham com os lubrificantes comerciais, podendo ser implementados no setor industrial, tendo em vista, que a pesquisa busca realizar o estudo de parâmetros físico-químicos que são essenciais para caracterizar um lubrificante de boa qualidade.

2.2.3 Biocatalisadores

2.2.3.1 Lipases

As lipases fazem parte da classe das hidrolases e têm a capacidade de catalisar a hidrólise de triglicerídeos em ácidos graxos livres e glicerol na interface óleo/água, bem como a conversão de triglicerídeos em glicerol. Além disso, também atuam na síntese de ésteres por meio de reações de esterificação (Mahfoudhi *et al.*, 2022).

As lipases utilizadas na indústria são, em sua maioria, de origem microbiana provinda de bactérias, fungos ou leveduras. Sua importância está na versatilidade, pois permite sua atuação em reações de esterificação, transesterificação, interesterificação, alcoólise e acidólise. Essas enzimas são amplamente empregadas na síntese de ésteres como biolubrificantes, além de diversas outras aplicações industriais (Vivek; Sandhia; Subramaniyan, 2022).

Segundo Almeida *et al.* (2024), o uso de lipases tem se destacado por sua capacidade de catalisar reações mesmo na presença de matérias-primas com alto teor de umidade e elevado índice de acidez, o que amplia sua aplicabilidade em diferentes processos. No mesmo estudo, os autores destacam as lipases de maior relevância, entre as quais se destaca a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), cuja estrutura cristalina está representada na Figura 2.6, e quando imobilizada em suporte comercial, essa lipase tem demonstrado alta atividade e eficiência como biocatalisador em reações de esterificação com ácidos graxos.

Figura 2.6 - Estrutura cristalina da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) - Código PDB 1TCA, 1TCB, 1TCC



Fonte: Protein Data Bank, 2020.

Vale ressaltar que a lipase derivada do pâncreas suíno *Rhizomucor miehei* (RML) também pode ser utilizada para sintetizar ésteres a partir de diversos álcoois, além de ser capaz de catalisar reações de hidrólise para formação de ácidos graxos (Tian *et al.*, 2021). Essa enzima está disponível comercialmente nas formas solúvel e imobilizada, apresentando alta atividade e boa estabilidade em diversas condições operacionais (Rodrigues; Fernandez-Lafuente, 2010).

No entanto, o alto custo das enzimas torna essencial a utilização de suportes para imobilização, os quais contribuam para a otimização dos processos catalíticos e a redução dos custos operacionais. Além disso, as lipases em sua forma livre apresentam baixa estabilidade, dificultando sua recuperação e reutilização após a reação, o que reforça ainda mais a importância da imobilização para viabilizar sua aplicação em escala industrial (Rafiee; Rezaee, 2021).

Logo, o estudo dessas enzimas imobilizadas em suportes de baixo custo e de origem natural é fundamental, pois pode viabilizar uma tecnologia mais acessível e sustentável para aplicação em escala industrial, além de contribuir para a redução dos impactos ambientais causados pelo descarte inadequado de resíduos (Almeida *et al.*, 2024).

Nesse contexto, Nájera-Martínez *et al.*, (2022) investigaram resíduos lignocelulósicos, como resíduos do coco, casca de arroz e do milho, e verificaram que esses materiais apresentaram alta afinidade por lipases, mostrando-se viáveis para aplicações industriais. Assim como, Levy *et al.* (2025) avaliaram a atividade da CALB, tanto na forma livre quanto imobilizada, utilizando suporte magnético de baixo custo derivado da lignina do bagaço de caju (suporte natural) na síntese do oleato de 2-etilhexila, alcançando rendimento de 90% em 36 h de reação com razão molar de 1:5 ácido: álcool e 40 mg/mL de catalisador.

Portanto, o estudo da imobilização de enzimas em suportes que aliem baixo custo a elevada eficiência de imobilização torna-se essencial, especialmente para aplicações sustentáveis e economicamente viáveis em processos biotecnológicos.

2.2.3.2 Imobilização enzimática

A imobilização enzimática envolve estratégias que visam aprimorar a atividade catalítica, a estabilidade e a reutilização em processos, sendo um método que

pode ocorrer com ou sem o uso de suporte. Essa abordagem tem se mostrado uma alternativa eficiente em aplicações industriais, como a produção de biolubrificantes, biodiesel, entre outros (Abdulmalek; Yan, 2022). Quando a imobilização envolve o uso de suportes, a escolha adequada desse material torna-se um fator determinante para o sucesso da imobilização, uma vez que suas características têm influência diretamente com a enzima (Rafiee; Rezaee, 2021; Nájera-Martínez *et al.*, 2022).

As técnicas de imobilização são divididas em duas categorias: métodos físicos (como adsorção, aprisionamento e ativação interfacial) e métodos químicos (como ligação covalente e reticulação) (Costantini; Califano, 2021). A imobilização por adsorção física ocorre por meio de interações fracas, predominantemente forças hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e interações de van der Waals. Já por métodos químicos, como a ligação covalente, há uma forte interação química entre as moléculas da enzima e o suporte, formando ligações estáveis (Ghasemi *et al.*, 2021).

A imobilização possibilita a reutilização do biocatalisador, contribuindo para a redução de custos e aprimorando características da enzima, como estabilidade térmica, pH e atividade catalítica (Costantini; Califano, 2021; Almeida *et al.*, 2024; Melo *et al.*, 2024).

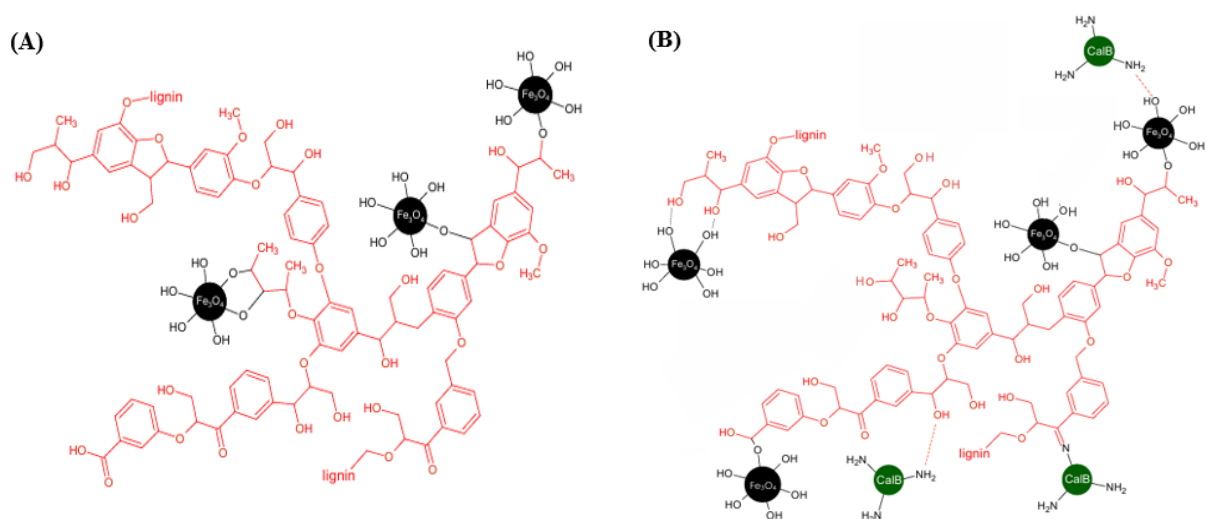
Os materiais utilizados na imobilização de enzimas geralmente apresentam boa compatibilidade, alta afinidade, presença de grupos funcionais reativos, além de serem mesoporosos, estáveis, não tóxicos, com capacidade de regeneração e reutilização, entre outras características desejáveis (Zdarta *et al.*, 2018). Nesse contexto, as nanopartículas magnéticas se destacam pelas seguintes vantagens: grande área de superfície, facilidade de modificação superficial, praticidade de serem removidas do meio reacional por aplicação de um campo magnético e podem ser reutilizados em novos ciclos de reação (Guo *et al.*, 2021).

As nanopartículas magnéticas podem ser obtidas por diferentes métodos, como co-precipitação, decomposição térmica, microemulsão, pirólise e liga mecânica. Entre essas técnicas, a co-precipitação se destaca por sua simplicidade e possibilidade de sintetizar óxidos de ferros, como Fe_3O_4 ou Fe_2O_3 , a partir de soluções aquosas contendo íons Fe^{2+} e Fe^{3+} (Abu-Dief; Abdel-Fatah, 2018). Após a síntese, grupos hidroxila (-OH) permanecem na superfície das nanopartículas, como o FeOH que possibilitam a ligação com alguns grupos funcionais, favorecem a estabilidade do suporte e facilitam a posterior imobilização enzimática (Abu-Dief; Abdel-Fatah, 2018).

Em vista disso, a combinação de nanopartículas magnéticas com outros materiais tem se mostrado uma abordagem promissora para a imobilização. Serpa *et al.*, (2021) estudou a lignina extraída do bagaço de caju associada com a magnetita, obtendo um suporte fácil de ser separado do meio reacional quando lhe é aplicado um campo magnético, além de apresentar boa biocompatibilidade e baixa toxicidade.

A lignina é um polímero de origem natural, podendo ser obtido a partir do bagaço de caju, que é uma matéria prima abundante na região do Nordeste e possui uma estrutura tridimensional com três grupos fenólicos: p-hidroxifenil (H), guaiacil (G) e siringil (S) (Serpa *et al.*, 2020; Serpa *et al.*, 2021; Ouattara *et al.*, 2023). Trata-se de um composto amorfo e ramificado, que pode ser aproveitado como material de suporte para a imobilização de enzimas, devido sua estrutura conter a presença de hidroxila, hidroxila alifática, que podem interagir com os grupos funcionais da enzima, além de ser uma alternativa sustentável (Serpa *et al.*, 2020; Serpa *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2024). Portanto, mais pesquisas com esse material ainda são relevantes. A Figura 2.7 apresenta-se a representação esquemática da lignina magnetizada com óxidos de ferro (A), em comparação com a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em um suporte magnético derivado da lignina do bagaço de caju (B).

Figura 2.7 – Lignina magnetizada (A) em comparação com a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em suporte magnético (B)



Fonte: Serpa *et al.*, (2021).

CAPÍTULO 3**PRODUÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES POR HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE ÓLEOS VEGETAIS EMPREGANDO LIPASE DE *Rhizomucor miehei* IMOBILIZADA EM COMPÓSITO MAGNÉTICO DE LIGNINA DO BAGAÇO DE CAJU****RESUMO**

A hidrólise de triglicerídeos para a obtenção de ácidos graxos livres (AGLs) é uma etapa importante para a produção de biolubrificantes e outros valiosos ésteres. Diante disso, o objetivo desta parte do estudo foi avaliar a eficiência catalítica da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), imobilizada em compósito magnético de lignina do bagaço de caju, na hidrólise dos óleos de soja, girassol, algodão e canola. O seu desempenho catalítico foi comparado com a hidrólise química. Inicialmente, foi realizada a extração da lignina do bagaço de caju, seguida pelo processo de síntese do compósito lignina-magnetita (Lig-Mag). Posteriormente, a enzima foi imobilizada no suporte Lig-Mag, avaliando-se duas cargas enzimáticas, 0,5 mg e 5 mg de proteína por g de Lig-Mag. Os biocatalisadores obtidos foram nomeados de Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5. Inicialmente, estudou-se a hidrólise catalisada com a enzima na forma livre, utilizando uma concentração de 5% (m/v) de enzima em relação à massa do óleo, correspondendo a 0,05 mg de proteínas/g de óleo, e avaliando as razões volumétricas de 1:1, 1:2 e 1:3 óleo/água, na temperatura de 50 °C, 150 rpm e nos tempos de 4 h, 12 h e 24 h. Na melhor razão volumétrica obtida, realizou-se as reações de hidrólise com os biocatalisadores Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5 por 24 h. Na hidrólise catalisada com RML na forma livre foram obtidos rendimentos próximos a 100% na razão de volumétrica de 1:3 óleo/água após 24 h de reação com todos os óleos avaliados. Os resultados obtidos com o biocatalisador Lig-Mag_RML_0.5 mostraram maiores rendimentos com os óleos de algodão e canola, obtendo $54,6 \pm 2,4\%$ e $40,0 \pm 0,8\%$, respectivamente. Já com o Lig-Mag-RML_5, a máxima porcentagem de hidrólise obtida foi com o óleo de algodão ($68,2 \pm 0,5\%$). A hidrólise química apresentou resultados maiores do que com a hidrólise enzimática utilizando os dois biocatalisadores (Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5), com exceção do óleo de algodão, em que na reação catalisada por Lig-Mag-LRM_5 obteve-se a maior porcentagem de hidrólise. Embora tenha-se obtidos menores

porcentagens de hidrólise usando os biocatalisadores Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5, principalmente usando os óleos de soja e girassol, a hidrólise enzimática se destaca como uma alternativa mais sustentável em relação à hidrólise química. Além disso, o biocatalisador magnético possui a vantagem de ser facilmente removido do meio reacional, apresentando potencial para gerar AGLs aplicáveis em produtos de alto valor agregado.

Palavras-chave: Óleos vegetais; hidrólise enzimática; lipase de *Rhizomucor miehei*; lignina.

3.1 Introdução

A hidrólise de óleos vegetais envolve a reação entre triglicerídeos e água, na presença ou ausência de um catalisador químico ou biológico, resultando na formação de ácidos graxos livres e glicerol. Nesse processo, a água rompe as ligações éster dos triacilgliceróis, possibilitando a liberação desses produtos (Guerra *et al.*, 2022).

Neste contexto, a hidrólise pode ocorrer por vias químicas ou enzimática. A hidrólise por meio de processo químico, ocorre inicialmente por saponificação do óleo, seguida da adição de ácido clorídrico ou ácido sulfúrico para liberar os AGLs, apresentando como vantagem a possibilidade de reutilização de óleos residuais. No entanto, o uso de ácidos fortes pode causar corrosão nos equipamentos, elevando os custos operacionais do processo e exige condições de temperatura mais elevada. Além disso, esses ácidos representam um desafio ambiental, pois precisam ser neutralizados antes do descarte, a fim de evitar impactos negativos ao meio ambiente (Nitbani *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2025). Por outro lado, a hidrólise catalisada por catalisadores biológicos, como as enzimas, pode ser realizada em temperaturas moderadas e é considerada uma alternativa ecologicamente correta (Nitbani *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2025).

Nesse sentido, a reação de hidrólise catalisada com o uso de lipases tem sido amplamente investigada, uma vez que essas enzimas são capazes de realizar a quebra dos triglicerídeos para a obtenção de ácidos graxos livres. Microrganismos são excelentes fontes de lipases, entre os quais se destaca a enzima produzida pelo fungo termofílico *Rhizomucor miehei* (RML), apresentando notável atividade em reações de hidrólise (Souza *et al.*, 2020; Fé *et al.*, 2024). Estudos com a RML, por exemplo, demonstraram

sua aplicação na obtenção de ácidos graxos livres a partir do óleo de soja convencional e epoxidado, obtendo resultados de hidrólise apenas com o óleo convencional (Wang; Schuman, 2013).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML), em reações de hidrólise, pode liberar diferentes ácidos graxos (palmítico, linoleico, oleico) a depender do tipo de óleo utilizado (Kotogán *et al.*, 2022). O interesse em seu estudo decorre do fato de que esses ácidos apresentam valor agregado e aplicação industrial, além de a RML se destacar por sua eficiência catalítica e por sua seletividade na clivagem das ligações éster nas posições 1 e 3 dos triglicerídeos, resultando na formação de ácidos graxos livres e monoacilglicerol (MAG), compostos com potencial para diversas aplicações (Chandler, Quinlan; McNeill, 1998; Calero *et al.*, 2014).

Os óleos vegetais de canola, soja e girassol são ricos em ácidos oleico e linoleico, enquanto o óleo de algodão apresenta maiores teores de ácido linoleico e palmítico (Khan *et al.*, 2022; Uppar; Dinesha; Kumar, 2024). Esses ácidos podem ser utilizados como aditivos funcionais em alimentos (Kotogán *et al.*, 2022), além de sua utilização na produção de biodiesel (Levy *et al.* 2025) e biolubrificantes (Júnior *et al.*, 2024; Monteiro *et al.*, 2024). Dentre os produtos reportados, destaca-se os biolubrificantes, que se apresentam como uma alternativa aos lubrificantes derivados do petróleo que quando descartados de forma incorreta causam impactos ambientais (Pinheiro; Quina; Gando-Ferreira, 2020).

Além da escolha da aplicação dos óleos vegetais e a rota de obtenção dos ácidos graxos livres, outro aspecto relevante está relacionado ao catalisador utilizado, pois as enzimas em sua forma livre apresentam algumas desvantagens, como a maior sensibilidade às variações do meio reacional (como temperatura e pH), além da dificuldade de reutilização em processos subsequentes (Salgado; Santos; Vanetti, 2022). Diante disso, protocolos de imobilização enzimática têm sido estudados com o objetivo de superar essas limitações, incluindo estudos usando suportes mais eficientes e obtidos de fontes renováveis (Serpa *et al.*, 2021; Girão *et al.*, 2023).

Um suporte que tem demonstrado resultados promissores na imobilização de lipases é o composto sintetizado da lignina do bagaço de caju com partículas de magnetitas, o que torna o material magnético. Essa combinação permite a fácil remoção do biocatalisador do meio reacional por meio da aplicação de um campo magnético, possibilitando sua reutilização em novas reações (Serpa *et al.*, 2021; Girão Neto *et al.*, 2023; Levy *et al.* 2025). No entanto, os estudos com este suporte se concentram mais nos

processos de imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, sendo interessante testar a sua aplicação na imobilização de outras fontes de lipase, bem como, que os biocatalisadores obtidos sejam avaliados em outras sínteses como, por exemplo, na hidrólise de triglicérides para obter ácidos graxos livres.

Portanto, este estudo tem como objetivo realizar a hidrólise enzimática dos óleos vegetais de soja, girassol, canola e algodão (devido os compostos presentes nestes óleos apresentarem aplicabilidade em diversas indústrias), utilizando um suporte magnético derivado da lignina do bagaço de caju para a imobilização da lipase *Rhizomucor miehei* (RML). Busca-se comparar o desempenho da enzima imobilizada com sua forma livre e com a hidrólise química, além de determinar a composição dos ácidos graxos obtidos, visando à produção de biolubrificantes.

A novidade deste estudo reside na utilização da lipase de *R. miehei* imobilizada em suporte magnético obtido da lignina do bagaço de caju, na hidrólise de óleos vegetais, aliado à comparação com a hidrólise química, evidenciando a possível viabilidade dos ácidos graxos de serem utilizados em reações de esterificação, bem como sua aplicação em outros seguimentos. A adoção destes materiais contribui para a economia circular e atende aos conceitos de biorrefinaria com processos sustentáveis, visto que no sistema não há aplicação de solventes, estando alinhado aos Objetivos de Desenvolvimento Sustentáveis (ODS).

3.2 Metodologia

3.2.1 Materiais

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) e o substrato *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) foram adquiridos da Sigma Aldrich, com sede em São Paulo, Brasil. O extrato enzimático apresentou uma concentração de proteína de 1,05 mg/mL e atividade catalítica de 204,3 U/mL. Os reagentes: ácido sulfúrico (95%), cloreto férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 97–102%), hidróxido de sódio (NaOH, 98%), hidróxido de amônio (NH_4OH , 24–26%) e sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 99%) foram adquiridos da empresa Dinâmica, também localizada em São Paulo, Brasil. O bagaço de caju (CAB) empregado nos experimentos foi obtido de uma cooperativa localizada no município de Pacajus, no estado do Ceará, Brasil. Os óleos vegetais comerciais de soja, canola, algodão e girassol foram adquiridos em estabelecimentos do mercado local da marca Lisa e Elogiata.

3.2.2 Método

3.2.2.1 Obtenção e síntese do compósito de lignina do CAB

Para a síntese do compósito lignina-magnetita, inicialmente foi feita a extração da lignina a partir do bagaço de caju (CAB), com base no protocolo descrito por Serpa *et al.* (2021). O CAB passou por um pré-tratamento ácido diluído com ácido sulfúrico a $0,6 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$, em que a parte sólida foi separada da fração líquida por filtração. A fração sólida foi submetida a um tratamento alcalino utilizando hidróxido de sódio a $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Após esse tratamento, as frações líquidas e sólida foram separadas por filtração. A fração sólida foi destinada a outros estudos conduzidos no Laboratório de Bioengenharia e Valorização da Biomassa e a fração líquida foi utilizada para recuperar a lignina. Esse biopolímero foi precipitado por meio de um tratamento ácido com ácido sulfúrico 72% (v/v). Após a precipitação, separou-se a lignina por centrifugação a 4500 rpm e $4 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 15 min e após foi submetida a sucessivas lavagens. Por fim, a lignina foi seca em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h.

Com a lignina seca, deu-se início ao processo de síntese do compósito seguindo a metodologia descrita por Serpa *et al.* (2021). Para isso, 0,6 g de lignina foram dissolvidos em 15 mL de hidróxido de amônio a 30% (v/v). Paralelamente, preparou-se uma solução contendo sais de ferro: cloreto de ferro hexahidratado ($\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e sulfato ferroso heptahidratado ($\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), dissolvidos separadamente em água ultrapura e posteriormente combinados em solução acidificada com HCl a 5% (v/v). A solução de lignina em hidróxido foi então adicionada lentamente à mistura de sais de ferro, e a suspensão resultante foi submetida à sonicação por 15 min, e um pulso de 0.75 on, com uma amplitude de 40%. Após esse processo, a mistura foi lavada com água ultrapura até atingir pH neutro e, em seguida, lavada com 100 mL de metanol concentrado. O material obtido foi seco à temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$) e o compósito foi denominado de Lig-Mag, o qual foi avaliado como suporte de imobilização.

A porcentagem de lignina extraída do bagaço de caju foi calculada com base na Equação 1.

$$\text{Rendimento (\%)} = \left(\frac{\text{massa de lignina}}{\text{massa de lignina teórica}} \right) \times 100 \quad (1)$$

em que Rendimento (%) corresponde a porcentagem extraída de lignina do CAB, massa de lignina é a massa (g) obtida após a extração e a massa de lignina teórica é a massa (g) de lignina que compõe o CAB utilizado (composição de 35,3% m/m) (Rocha *et al.*, 2014).

O rendimento de Lig-Mag obtido foi calculado com base na quantidade de massa do compósito obtida (g), pela quantidade de lignina utilizada inicialmente para a síntese, com base na Equação 2.

$$\text{Rendimento} \left(\frac{\text{g}}{\text{g}} \right) = \frac{\text{Massa final do compósito}}{\text{Massa inicial de lignina}} \quad (2)$$

3.2.2.2 Imobilização da lipase de *R. miehei* no Lig-Mag

Inicialmente determinou-se a concentração de proteínas do extrato enzimático pelo método de Bradford, utilizando albumina sérica bovina como padrão (Bradford, 1976). Com base na concentração de proteínas obtida, calculou-se a quantidade exata de proteína a ser oferecida ao suporte. A carga proteica destinada à imobilização foi fixada em 0,5 mg e 5 mg de proteína por g de Lig-Mag, com o objetivo de analisar a eficiência de produção dos AGLs sob condições de baixa e alta carga de biocatalisador. O processo de imobilização foi realizado com base no protocolo descrito por Moreira *et al.*, (2020), com adaptações, utilizando tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7) a 25 °C em agitação suave (usando um homogeneizador rotativo) por 24 h. Um ensaio foi realizado na ausência do suporte Lig-Mag como controle. Após, os biocatalisadores foram filtrados a vácuo e lavados com tampão fosfato de sódio a 25 mM (pH 7), conforme descrito por Girão Neto *et al.* (2023). Ao final da imobilização os biocatalisadores magnético foram denominados de Lig-Mag-RML_0.5 e Lig-Mag-RML_5. As atividades catalíticas foram determinadas conforme descrito no item 3.2.2.3.

3.2.2.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática inicial e remanescente no sobrenadante da RML foi determinada por meio da auto hidrólise do *p*-NPB, conforme descrito por Tsujita; Ninomiya; Okuda (1989). Para o ensaio, foram utilizados 12,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7), 250 µL de *p*-NPB e 250 µL do sobrenadante das amostras, iniciando-

se a reação de hidrólise sob agitação a 1000 rpm, em temperatura ambiente (25 °C). Aliquotas da reação foram coletadas em intervalos determinados e transferidas para cubetas, sendo medida em espectrofotômetro (Eppendorf, São Paulo, Brasil) com comprimento de onda de 348 nm durante 5 min. Com base nas leituras de absorbância em função do tempo, foi construída uma curva, e os valores da inclinação da reta obtida tanto para a auto hidrólise (branco) quanto para as amostras de sobrenadante foram utilizados para calcular a atividade catalítica da amostra controle e do sobrenadante, conforme descrito na Equação 3.

$$At = \frac{(\text{slope amostra} - \text{slope branco}) \times V_{\text{reacional}} \times D \times f}{V_{\text{enzima}}} \quad (3)$$

em que At representa a atividade enzimática (U/mL); 'slope da amostra' refere-se à inclinação da curva de absorbância obtida para a amostra, enquanto 'slope do branco' corresponde à inclinação referente à auto hidrólise (controle); $V_{\text{reacional}}$ é o volume total da solução utilizada na reação (mL); D representa o fator de diluição aplicado à amostra; f é o fator de correção, cujo valor é 0,1942; e V_{enzima} corresponde ao volume de enzima utilizado para a determinação da atividade (mL).

A atividade catalítica do biocatalisador Lig-Mag_RML foi determinada conforme a metodologia descrita por Girão Neto *et al.* (2023). Para a realização da reação, foram usados aproximadamente 0,01 g do material imobilizado, 12,75 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7) e 250 µL de ρ -NPB. A mistura reacional foi submetida à agitação de 1000 rpm, em temperatura ambiente (25 °C). Durante o processo, alíquotas da suspensão foram coletadas em intervalos específicos e suas absorbâncias foram registradas conforme descrito anteriormente. A atividade catalítica foi então calculada pela Equação 4,

$$At_{\text{Biocatalisador}} = \frac{(\text{slope amostra} - \text{slope branco}) \times V_{\text{reacional}} \times f}{m_{\text{enzima}}} \quad (4)$$

em que o termo $At_{\text{Biocatalisador}}$ refere-se à atividade do biocatalisador (U/g); *slope* da amostra representa o valor da absorbância obtido no espectrofotômetro, enquanto o *slope* do branco corresponde à auto hidrólise (controle); o fator f é um valor de correção igual a 0,1942; $V_{\text{reacional}}$ indica o volume total da solução (mL), e m é a massa do biocatalisador utilizado na determinação da atividade (g).

A partir das atividades enzimáticas, iniciais e a após o processo de imobilização, determinou-se o rendimento de imobilização conforme a Equação 5,

$$R (\%) = \left(\frac{At_{inicial} - At_{\text{após imobilização}}}{At_{inicial}} \right) \times 100 \quad (5)$$

R(%) representa a porcentagem de rendimento da imobilização. $At_{inicial}$ corresponde à atividade enzimática do controle (U/mL), enquanto $At_{\text{após a imobilização}}$ refere-se à atividade enzimática presente no sobrenadante da solução após o processo de imobilização (U/mL).

A partir das Equações 6 e 7, foi calculado a eficiência de imobilização com a equação 8, que corresponde a quantidade de enzima foi fixada ao suporte durante o processo de imobilização.

$$At_{oferecida} = \frac{At_{oh} \times V_{reacional}}{Massa \text{ do suporte}} \quad (6)$$

$$At_{teórica} = At_{oferecida} \times R(\%) \quad (7)$$

$$E (\%) = \left(\frac{At_{Biocatalisador}}{At_{teórica}} \right) \times 100 \quad (8)$$

em que E (%) corresponde a eficiência de imobilização em porcentagem, $At_{Biocatalisador}$ corresponde a atividade do biocatalisador após a imobilização e o termo $At_{teórica}$ corresponde a atividade oferecida multiplicado pelo rendimento e a $At_{oferecida}$ é a atividade inicial (controle enzima livre) multiplicado pelo volume da solução total (mL) (enzima, suporte e tampão) e massa do suporte e a quantidade (g) de suporte é adicionada a solução.

3.2.2.4 Hidrólise enzimática dos óleos vegetais (canola, algodão, girassol e soja)

A reação de hidrólise enzimática foi realizada com base em Fé *et al.* (2024), com adaptações. A reação foi conduzida usando os óleos vegetais de soja, girassol, canola e algodão, separadamente, avaliando-se as razões volumétricas de 1:1, 1:2 e 1:3 de óleo/água (volume das soluções fixo em 10 mL). Inicialmente os experimentos foram realizados com a enzima RML na sua forma livre. A quantidade de enzima livre utilizada foi de 5% (m/v) em relação à massa dos óleos vegetais, correspondendo a 0,05 mg de

proteína por g de óleo para três razões volumétricas, na temperatura de 50 °C e 150 rpm, avaliando-se os tempos de 4 h, 12 h e 24 h. Como controle, foi realizada uma reação contendo apenas óleo e água, mantida sob as mesmas condições experimentais das demais reações. As reações foram interrompidas pelo aquecimento em banho termostático por 5 min, para desnaturação da enzima na temperatura de 90 °C. Após, água a 60 °C foi adicionada, conforme a massa de óleo de cada razão volumétrica. A mistura resultante foi submetida à separação de fases utilizando um funil de separação. O teor de ácido graxo na fase oleosa foi analisado por titulação, baseando-se no método Ca 5a-40 (AOCS, 1998), que consiste na titulação ácido-base utilizando NaOH (0,1 mol·L⁻¹) previamente padronizado como titulante. A porcentagem de hidrólise foi obtida com base na Equação 9,

$$\text{Hidrólise (\%)} = \frac{V \times M_{\text{NaOH}} \times MM_{\text{ácidos graxos}}}{m \times f} \times 100 \quad (9)$$

em que Hidrólise (%) representa a porcentagem de hidrólise; V correspondem, respectivamente, ao volume de NaOH consumido na titulação das amostras do início e do final do processo de hidrólise, em mL; M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH, 0,1 mol/L; MM_{ácidos graxos} corresponde à massa molar média dos ácidos graxos (g/mol), a qual varia conforme o tipo de óleo utilizado. Esse valor foi estimado com base na composição dos ácidos graxos obtidos por hidrólise química, permitindo a posterior comparação dos dados por cromatografia gasosa (CG). Foram adotados os seguintes valores: 274,89 g/mol para os ácidos do óleo de algodão, 278,67 g/mol para o óleo de canola, 280,03 g/mol para o óleo de girassol e 278,4 g/mol para o óleo de soja; m é a massa da amostra utilizada na titulação (g); e f representa a fração do óleo utilizada no início da reação.

Para avaliar a hidrólise enzimática utilizando a RML imobilizada em Lig-Mag, foram adotadas as condições ideais previamente determinadas com a enzima em sua forma livre, tendo em vista que foram condições que propiciaram altos rendimentos de hidrólise. Nestas reações avaliou-se os biocatalisadores obtidos com carga de 0,5 mg e de 5 mg de proteína por g de Lig-Mag, denominados de Lig-Mag-RML_0.5 e Lig-Mag-RML_5. A quantidade fixa de biocatalisador utilizada foi de 3% (m/v), e as reações foram conduzidas por 24 h.

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como a média, desvio padrão e com análise estatística pelo teste de *Tukey*.

3.2.2.5 Hidrólise química dos óleos vegetais (canola, algodão, girassol e soja)

A hidrólise química dos óleos vegetais foi realizada com base no método descrito por Bart *et al.* (2010), com adaptações. A etapa inicial consistiu em uma reação de saponificação, realizada separadamente com os óleos de algodão, girassol, soja e canola. Os ensaios foram conduzidos utilizando uma concentração de 30,7% (m/v) do óleo vegetal, solução aquosa de NaOH ($2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$), correspondendo a 55,4% (v/v) da mistura reacional e 13,9% (v/v) de etanol com concentração 95% (v/v) (para solubilização dos triglicerídeos), sob temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm e tempo de 24 h. Após esse período, foi adicionado 11,8% (v/v) de HCl concentrado à mistura, que então foi mantida nas mesmas condições por mais 1 h. Ao final, a solução foi transferida para um funil de separação e a fase oleosa foi coletada para posterior análise por titulação e cromatografia gasosa (CG). O método e a equação para determinar a porcentagem de hidrólise química foram os mesmos empregados na hidrólise enzimática (Tópico 3.2.2.4).

3.2.2.6 Preparação dos ácidos graxos obtidos da hidrólise química e enzimática para análise de Cromatografia Gasosa (CG)

Para identificar os ácidos graxos formados durante a reação da hidrólise enzimática, estes foram convertidos em ésteres metílicos, conforme o método descrito por Levy *et al.*, (2025). Inicialmente, 100 mg do ácido graxo foi colocado em um tubo falcon de 50 mL e adicionado 3 mL de hexano (grau CG). Em seguida, 4 mL de solução de hidróxido de sódio 0,5 mol/L em metanol foram adicionados. A mistura foi submetida a aquecimento em banho-maria a 68 °C até a solução se tornar transparente. Após essa etapa, 5 mL da solução esterificante (preparada com 10 g de NH_4Cl , 300 mL de metanol e 15 mL de H_2SO_3) foram adicionados. A mistura foi agitada em vórtex por 30 s e posteriormente aquecida na mesma condição inicial. Após, o tubo foi resfriado em água corrente. Em seguida, 4 mL de solução de cloreto de sódio foram adicionados, e a solução foi vigorosamente agitada em vórtex por 30 s. Depois, 3 mL de hexano grau CG foram incorporados e novamente agitados. A mistura foi então transferida para um funil de separação para permitir a separação das fases. O sobrenadante foi diluído com 1 mL de hexano grau CG. Por fim, a amostra foi analisada por cromatografia gasosa (CG), conforme descrito no item 3.2.2.7.

3.2.2.7 Determinação da composição de ácidos graxos de óleos vegetais por cromatografia gasosa (CG)

Os ésteres metílicos de ácidos graxos resultantes da hidrólise química e enzimática foram analisados por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) utilizando um cromatógrafo a gás Agilent 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, EUA) equipado com um detector de massas quadrupolo MSD-5977A. Hélio foi utilizado como gás de arraste em uma coluna HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Agilent). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 °C e 150 °C, respectivamente. O tempo total de corrida foi de 33,7 min, iniciando a 35 °C com uma rampa de temperatura de 15 °C/min até 180 °C, seguida de 5 °C/min até 250 °C, mantida por 10 min. Os compostos foram identificados comparando seus padrões de fragmentação em massa com o banco de dados NIST 2.0. Os índices de retenção foram calculados usando uma série de n-alcenos (C₇–C₄₀) e comparados com valores relatados na literatura (NIST, 2018).

3.2.3 Análise estatística

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), utilizando o teste de *Tukey* (One-Way ANOVA), com base no valor de *p* com intervalos de mínimos de diferenças significativas e determinado pelo nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.3 Resultados e Discussões

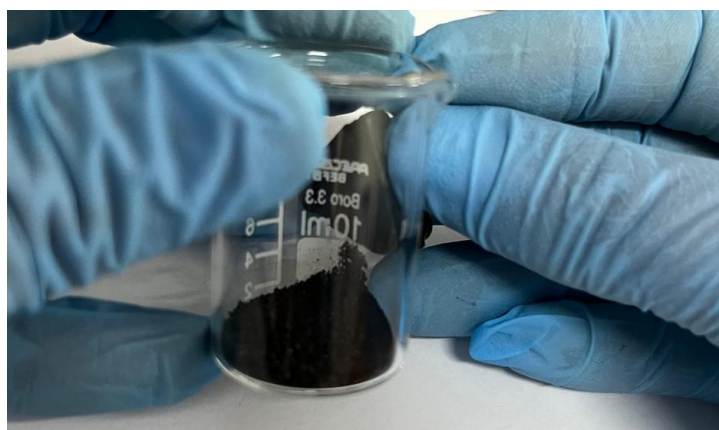
3.3.1 Rendimento de extração da lignina e do compósito Lig-Mag

A quantidade de lignina extraída do bagaço de caju (CAB) após o tratamento ácido/alcalino foi de 0,22 g por g de bagaço seco. De acordo com a composição relatada por Rocha *et al.* (2014), a lignina representa aproximadamente 33,6% e 35,3% (m/m) do CAB. Com base nesses dados, a eficiência de extração foi estimada em 62,34%.

A quantidade total do compósito (Lig-Mag) obtido após a etapa de magnetização foi de 1,35 g por grama de lignina, o que é consistente com os valores

relatados por Levy *et al.* (2025), que empregaram um procedimento de magnetização semelhante. A Figura 3.1 exibe o comportamento do composto Lig-Mag sendo atraída pela ação de um campo magnético.

Figura 3.1 – Compósito Lig-Mag com ação magnética



Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Imobilização da lipase RML no suporte Lig-Mag

A Tabela 3.1 apresenta os parâmetros de imobilização da enzima *Rhizomucor miehei* no Lig-Mag, demonstrando um rendimento de imobilização de 99,78%, usando uma carga de proteína de 0,5 mg por g de suporte, com eficiência de 15,2%. Para a carga enzimática de 5 mg de proteína o rendimento de imobilização foi de 49,4% e eficiência de 19,3%, pela análise estatística não teve diferenças significativa entre as duas eficiências analisadas.

Tabela 3.1 – Parâmetros do processo de imobilização da lipase *Rhizomucor miehei* no compósito Lig-Mag em tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7) por 24 h

Parâmetro de imobilização	Carga enzimática de 0,5 mg de proteína por g de suporte	Carga enzimática de 5 mg de proteína por g de suporte
Rendimento (%)	99,7 ± 0,1 ^a	49,4 ± 0,2 ^b
Atividade oferecida (U/g)	97,2 ± 0,5 ^a	527,2 ± 1,7 ^b
Atividade do biocatalisador (U/g)	14,7 ± 2,8 ^a	50,5 ± 1,3 ^b
Eficiência (%)	15,2 ± 3,1 ^a	19,3 ± 0,5 ^a

* As letras representam o resultado da análise estatística de Tukey ($p < 0,05$) por parâmetro, e letras diferentes indicam diferença significativa.

Fonte: Elaborada pela autora.

A parcial imobilização utilizando uma carga de proteína maior se deve a possível saturação do Lig-Mag nas condições de ensaio. Resultados semelhantes também foram observados em estudos realizados por Girão Neto *et al.* (2023), empregando a lipase B de *Candida antarctica*, no qual quando se aumentou a carga de enzima oferecida ao suporte houve uma diminuição da eficiência de imobilização. Esse comportamento de redução utilizando uma concentração maior de enzima também foi observado imobilizando a enzima em outros tipos de suporte. Fernandez-Lopez *et al.* (2017), por exemplo, ao imobilizarem a lipase *Rhizomucor miehei* em esferas de octil agarose com uma carga de 7 mg/g de suporte, observaram uma atividade significativamente menor ($17,9 \pm 0,8$ U/g) em comparação à obtida com uma carga mais baixa de 1 mg/g ($65,8 \pm 2,0$ U/g). Nessa imobilização com esferas de octil agarose, a redução observada foi atribuída a limitações difusionais, que ocorrem quando o excesso de enzima dificulta o acesso do substrato aos centros ativos.

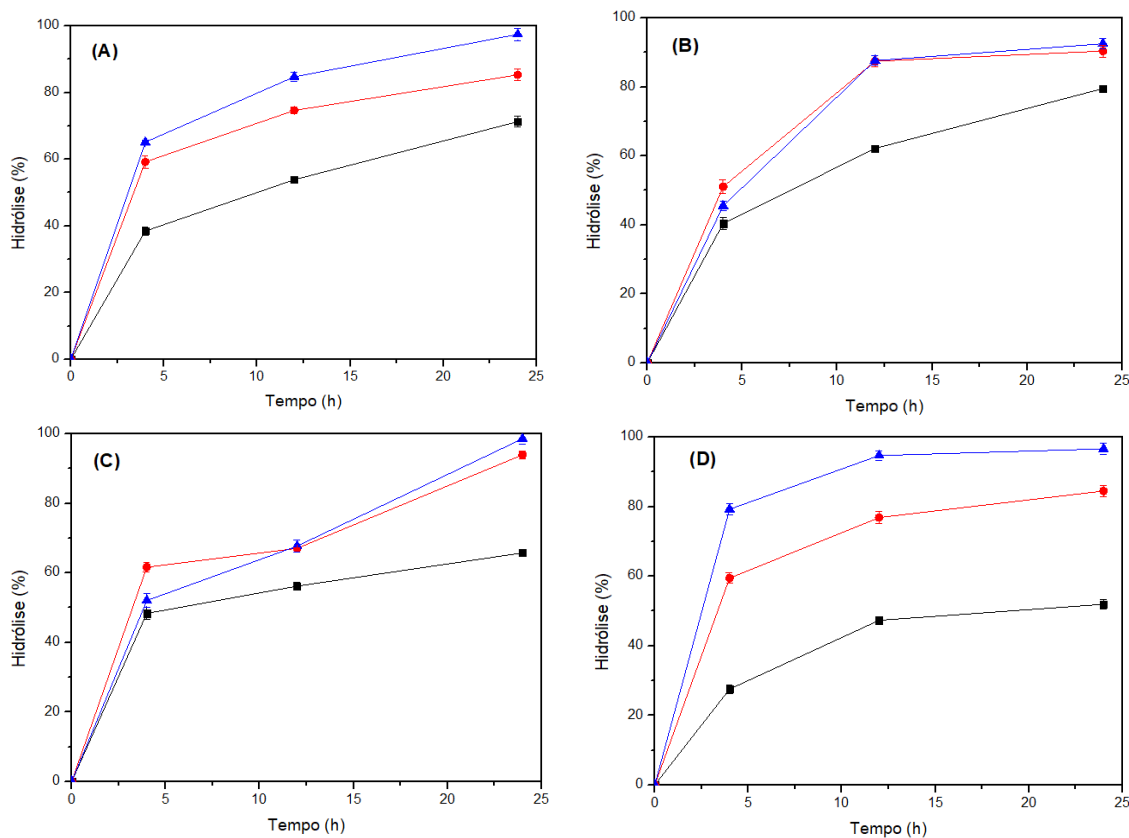
No presente estudo, ao utilizar o compósito Lig-Mag, não foi observada redução na atividade catalítica utilizando uma carga mais elevada de enzima. Esse resultado é atribuído ao uso de nanopartículas, cuja pequenas dimensões favorecem o acesso do substrato aos centros ativos (Moreira *et al.*, 2020). Com isso, avaliou-se o desempenho de ambos biocatalisadores (Lig-Mag_RML_0.5 e o Lig-Mag_RML_5), nas reações de hidrólise para obtenção de ácidos graxos livres dos óleos vegetais de canola, girassol, soja e algodão, com o objetivo de determinar qual o biocatalisador mais eficaz na produção dos AGL.

3.3.3 Reações de hidrólise enzimática com a enzima livre e imobilizada

3.3.3.1 Ensaio com a enzima livre

A Figura 3.2 apresenta o perfil de rendimento de ácidos graxos livres obtidos a partir dos óleos vegetais de canola (Fig. 3.2A), soja (Fig. 3.2B), girassol (Fig.3.2C) e algodão (Fig. 3.2D), usando como catalisador a enzima RML na forma livre. Entre as diferentes razões volumétricas avaliadas, a proporção de 1:3 (óleo/ água) se destacou com todos os óleos, alcançando conversões próximas de 100%. Esses resultados indicam uma excelente eficiência na produção de ácidos graxos livres utilizando a RML.

Figura 3.2 – Porcentagem de hidrólise obtidos nas reações usando óleo de canola (A), soja (B), girassol (C) e algodão (D), catalisadas por RML na forma livre, a diferentes razões volumétricas óleo/água de 1:1 (■); 1:2 (●) e 1:3 (▲). Temperatura de 50 °C, 150 rpm e 0,05 mg de proteínas por g de óleo. As linhas representam uma linha de tendência



Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostram que, com o aumento da quantidade de óleo, ocorre uma redução na formação de ácidos graxos livres, como observado na razão de 1:1 (óleo/água), que apresentou menores valores de hidrólise quando comparada às razões de 1:2 e 1:3. Esse comportamento está relacionado à coalescência das gotículas de óleo, que reduz a área interfacial da emulsão e, conseqüentemente, dificulta a interação da enzima com o substrato (Avelar *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2013).

A lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) é uma enzima 1,3-específica, sendo esperado um rendimento teórico máximo de aproximadamente 66% de hidrólise. No entanto, valores superiores a esse limite podem ser atribuídos à ocorrência de migração de acila, um processo no qual há a transferência espontâneo do grupo acila da posição *sn-2* para as posições *sn-1* ou *sn-3*. Esse fenômeno explica as elevadas porcentagens de hidrólise observadas nas razões de 1:2 e 1:3, onde os valores de hidrólise foram próximos de 100% (Banerjee *et al.*, 2013). Indicando que na razão volumétrica de 1:1 houve

hidrólise total e nas razões de 1:2 e 1:3, podendo ter ocorrido uma produção de intermediários como monoacilglicerol (MAG) e diacilglicerol (DAG).

Contudo, na razão de 1:3 óleo/água, a quantidade de água é três vezes superior à de óleo, o que sugere uma influência da concentração de água no processo. Esse comportamento também foi observado por Guerra *et al.* (2022), que relataram um aumento na taxa de hidrólise com o aumento da concentração de água. No entanto, os autores também destacam que um excesso de água pode causar uma redução na produção dos AGLs, devido haver uma diminuição da hidrofobicidade do meio reacional, comprometendo a ativação interfacial da lipase. Rodrigues e Ayub (2011) observaram também uma alta porcentagem de hidrólise na razão de 1:3 óleo/água utilizando a RML, assim como também identificaram que um aumento da quantidade de água diminuía a quantidade de produto formado.

A Figura 3.2A apresenta a porcentagem de hidrólise do óleo de canola, na qual é possível observar o aumento de formação de ácidos graxos ao longo do tempo. Após 12 h de reação, a conversão na razão óleo/água de 1:3 já ultrapassava $80 \pm 0,4\%$.

A Figura 3.2B mostra a porcentagem de hidrólise do óleo de soja. No tempo de 12 h de reação, nas razões volumétricas de 1:2 e 1:3 óleo/água, a porcentagem hidrolisada estava próxima de $90 \pm 0,3\%$, tendo um aumento apenas na razão de 1:3 ao final das 24 h.

O óleo de canola, em comparação ao óleo de soja, apresentou diferença nos valores de hidrólise nas razões óleo/água de 1:2 e 1:3 após 24 h de reação. Já para o óleo de soja, os valores nestas razões foram próximos. Isso está relacionado à forma como o óleo se dispersa na água e ao acesso das moléculas de água à interface, sugerindo que nem sempre o aumento da quantidade de água melhora a conversão (Filipe *et al.*, 2021).

A Figura 3.2C apresenta a formação de ácidos graxos a partir do óleo de girassol. Observa-se que, nas primeiras 12 h de reação, a porcentagem hidrolisada era relativamente baixa em comparação aos óleos de soja (Fig. 3.2B) e canola (Fig. 3.2A), apresentando um aumento após esse período. Na razão volumétrica de 1:1 (óleo: água), a porcentagem produzida de ácidos manteve-se constante e inferior em relação às demais proporções avaliadas.

A Figura 3.2D corresponde a porcentagem de hidrólise utilizando o óleo comercial de algodão. Na razão de 1:3 óleo/água, a porcentagem de hidrólise ultrapassou $90 \pm 0,9\%$ já nas primeiras 12 h de reação e permaneceu constante até as 24 h. Nessa

reação o equilíbrio é atingido em 12 h, apresentando uma influência do aumento da quantidade de água.

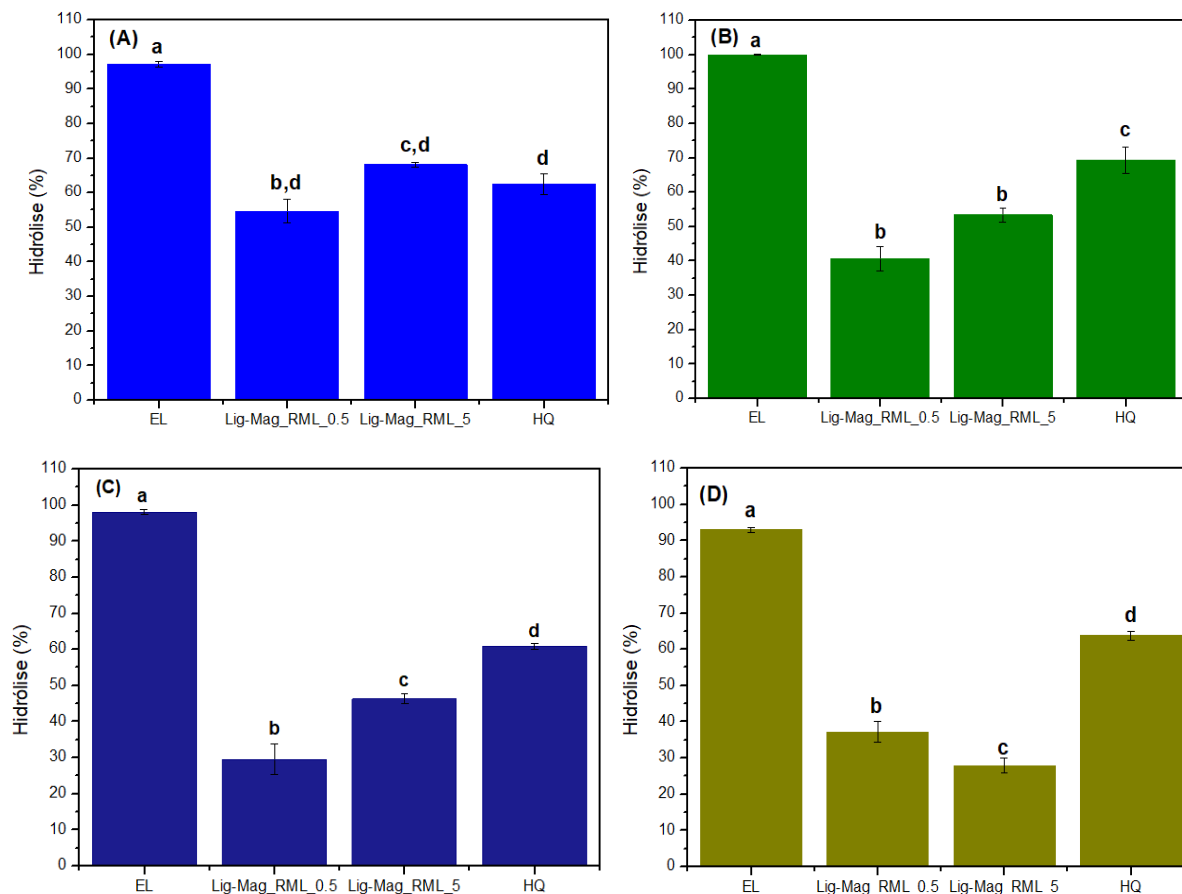
Todos os óleos analisados apresentaram elevada taxa de hidrólise ao final das 24 h, com valores próximos de 100%. Nas outras razões avaliadas como, por exemplo, 1:1 óleo/água, as porcentagens de hidrólise são mais baixas, o qual estes resultados mostram claramente que o aumento da proporção de óleo no meio de reação pode resultar na formação de gotículas com menor área (agregação de moléculas de óleo) ou drástica redução de pH no meio (elevada concentração de AGL liberados no meio) podendo interferir na atividade da enzima. Crooks *et al.* (1995), estudaram o efeito do pH em reações de hidrólise utilizando a RML, encontrando uma atividade máxima em $\text{pH} \approx 7,5$.

Com base nos resultados obtidos com a enzima na forma livre, que permitiram determinar a melhor razão óleo/água e o tempo ótimo de reação, selecionou-se as seguintes condições: razão volumétrica de 1:3 (v/v) (Razão na qual pode ter ocorrido a formação de produtos intermediários) e tempo de 24 h, para avaliar os biocatalisadores Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5 nas reações de hidrólise, simultaneamente comparar os resultados com a hidrólise química.

3.3.3.2 Comparação da hidrólise enzimática com a hidrólise química

A Figura 3.3 apresenta as porcentagens de hidrólise do óleo de algodão (Fig. 3.3 A), soja (Fig. 3.3 B), canola (Fig. 3.3 C) e girassol (Fig. 3.3 D), obtidas nas reações usando os biocatalisadores Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5, em comparação com as porcentagens de hidrólise obtidas no processo químico (comparação entre um processo homogêneo com um heterogêneo). As maiores porcentagens de hidrólise foram observadas com os óleos de algodão e canola, enquanto o óleo de soja e girassol apresentaram as menores taxas de produção dos ácidos, utilizando os biocatalisadores imobilizados.

Figura 3.3 – Comparação entre a hidrólise catalisada pela enzima na forma livre (EL) e imobilizada (Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5) com a hidrólise química (HQ) para obtenção de ácidos graxos livres usando o óleo de algodão (A), canola (B), girassol (C) e soja (D). Condições: Temperatura de 50 °C, agitação de 150 rpm e tempo de reação de 24 h



Fonte: Elaborada pela autora.

A Figura 3.3A apresenta a hidrólise a partir do óleo de algodão, nela observa-se que na reação usando Lig-Mag_RML_0.5, a porcentagem de hidrólise foi de $54,6 \pm 2,4\%$, enquanto na reação catalisada por Lig-Mag_RML_5 foi de $68,2 \pm 0,5\%$, superior ao valor obtido com a hidrólise química ($62,2 \pm 1,7\%$) e pela análise de estatística não apresentam diferenças significativas. Esses resultados são explicados pela composição do óleo de algodão que com base na literatura um dos compostos majoritários é o ácido palmítico, o qual a RML apresenta afinidade (Thompson *et al.*, 2019 ; Ghide *et al.*, 2022).

Na Figura 3.3B mostra a porcentagem de hidrólise com o óleo de canola, nela utilizando o Lig-Mag_RML_0.5 foi obtido $40 \pm 0,8\%$ e com o Lig-Mag_RML_5 de $53,4 \pm 1,4\%$, sendo inferior a hidrólise química, que se obteve $70,5 \pm 2,8\%$, contudo a enzima

na forma livre obteve porcentagem de produção de ácidos, com valores próximos de 100%.

A Figura 3.3C apresenta os resultados obtidos com o óleo de girassol, cuja porcentagem de hidrólise obtida da reação catalisada por Lig-Mag_RML_0.5 foi de $29,5 \pm 2,9\%$ e com o Lig-Mag_RML_5 de $45,3 \pm 1,9\%$, sendo também inferior a hidrólise química com porcentagem de hidrólise de $60,9 \pm 0,6\%$.

Por fim, a Figura 3.3 (Fig. 3.3D) apresenta os resultados da porcentagem de hidrólise utilizando o óleo de soja. Observa-se que o biocatalisador Lig-Mag_RML_0.5 proporcionou um valor de hidrólise superior ao do Lig-Mag_RML_5, com porcentagens de $37,2 \pm 1,9\%$ e $28,9 \pm 0,4\%$, respectivamente. No entanto, a hidrólise química apresentou um desempenho ainda maior, atingindo $63,7 \pm 0,8\%$.

A partir dos resultados obtidos com a hidrólise química e hidrólise enzimática, observou-se que a hidrólise química (homogênea) apresentou maiores porcentagens de hidrólise quando em comparação com a hidrólise enzimática utilizando o Lig-Mag_RML_0.5 e o Lig-Mag_RML_5 (catálise heterogênea), com os óleos de soja, canola e girassol. Neste caso a enzima na forma imobilizada foi mais seletiva e com isso promoveu um maior rendimento utilizando o óleo de algodão.

No óleo de algodão, os ácidos graxos majoritário são o ácido linoleico e palmítico (Khan *et al.*, 2022). A composição do óleo influencia diretamente nas taxas de produção de ácidos graxos, uma vez que, segundo dados da literatura, a RML apresenta afinidade pelo ácido palmítico, um dos principais compostos presente neste óleo, o que pode explicar os resultados obtidos no presente estudo, principalmente com os biocatalisadores Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5, onde a enzima foi mais seletiva. Ghide *et al.* (2022) demonstraram essa afinidade ao utilizarem a RML imobilizada em nanotubos de carbonos magnéticos para a síntese de lipídeos estruturados ricos em ácido palmítico, obtendo 93,46% desse ácido graxo na composição dos lipídeos.

Quando em comparação a hidrólise química com a hidrólise utilizando a enzima na forma livre as porcentagens de hidrólise foram maiores com todos dos óleos (canola, soja, girassol e algodão) e com valores próximos de 100%. A enzima na forma livre apresenta maior facilidade de acesso ao substrato, por não ter barreiras. Em contrapartida, na forma imobilizada, a catálise pode ser limitada por efeitos de transferência de massa e difusão, o que reduz a eficiência de conversão e, conseqüentemente, o rendimento dos produtos (Sheldon; Van Pelt, 2013). Além disso, a

diferença na concentração de proteínas ativa na forma livre e imobilizada também pode impactar na hidrólise dos produtos.

Ao utilizar o Lig-Mag_RML_0.5, as porcentagens de hidrólise obtidas foram próximas às alcançadas com o Lig-Mag_RML_5, com alguns dos óleos e apresentando um valor mais elevado nos ensaios com o óleo de soja. Isso mostra que o uso de uma carga menor de biocatalisador pode ser mais eficiente e econômica. Nas condições testadas, o biocatalisador com maior carga de proteína (5 mg g^{-1}) pode ter restringido o acesso das gotas de óleo ao seu microambiente, enquanto a menor carga ($0,5 \text{ mg g}^{-1}$) favoreceu um acesso mais satisfatório, resultando em melhor desempenho. Assim, estudos futuros de reuso do biocatalisador em sucessivas bateladas serão realizados utilizando uma baixa carga inicial de lipase.

De modo geral, o biocatalisador imobilizado apresentou bom desempenho. Pois, foi possível observar a produção de ácidos graxos nas duas cargas de proteína analisada, especialmente com os óleos de algodão e canola, o que evidencia sua eficiência no processo e os biocatalisadores imobilizados no suporte magnético apresenta a vantagem de facilmente ser removido do meio reacional. Além disso, a hidrólise enzimática tem a vantagem de dispensar o uso de reagentes mais agressivos, contribuindo para um processo mais sustentável e menos agressivo ao meio ambiente.

3.3.3.3 Comparação dos ácidos graxos formados na hidrólise enzimática e química

Após a comparação das eficiências de hidrólise, a composição dos ácidos graxos obtidos foi avaliada para melhor compreender a seletividade de cada processo. A Tabela 2 resume a composição de ácidos graxos livres obtida por hidrólise enzimática (enzima livre, Lig-Mag_RML_0,5 e Lig-Mag_RML_5) em comparação com a hidrólise química do óleo de algodão, determinada por cromatografia gasosa.

Tabela 3.2- Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de algodão. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química

Compostos	Hidrólise enzimática			Hidrólise Química (%)
	Livre (%)	Lig-Mag_RML_0,5 (%)	Lig-Mag_RML_5 (%)	
Ácido linoleico (C18:2)	48,04	46,29	46,03	49,6
Ácido palmítico (C16:0)	25,31	25,4	24,7	25,7
Ácido oleico (C18:1)	22,00	22,91	22,78	19,7
Ácido esteárico (C18:0)	3,32	3,81	4,19	2,9
Ácido mirístico (C14:0)	0,77	0,79	0,87	-
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,28	0,40	0,46	-
Ácido cis-10-nonadecenóico (C19:1)	0,16	0,21	0,24	-
Ácido araquídico (C20:0)	0,13	0,21	0,26	-
Ácido eláidico (C18:1)	-	-	-	2,1

Fonte: Elaborado pela autora.

Para o óleo de algodão, os principais ácidos graxos identificados na hidrólise química foram o ácido linoleico (49,6%), o ácido palmítico (25,7%) e o ácido oleico (19,7%). Esses mesmos constituintes também foram detectados na hidrólise enzimática. Além disso, a hidrólise enzimática, tanto na forma livre quanto imobilizada, permitiu a detecção de ácidos graxos adicionais, como o ácido araquídico, o ácido cis-10-nonadecenóico, o ácido palmitoleico e o ácido mirístico. De acordo com a literatura, o óleo de algodão é composto predominantemente por ácido linoleico (52,8%), seguido por ácido palmítico (25,5%) e ácido oleico (16,4%) (Kaur *et al.*, 2025). No geral, ambas as rotas de hidrólise permitiram a recuperação dos principais ácidos graxos; no entanto, a hidrólise enzimática apresentou maior seletividade, conforme sugerido pelos resultados discutidos na seção anterior.

O óleo de algodão contém uma mistura de ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados, sendo o ácido linoleico o principal componente. Devido ao teor relativamente alto de ácidos graxos saturados, como os ácidos palmítico e esteárico, esses compostos podem solidificar parcialmente à temperatura ambiente

(Salih; Salimon, 2021). Além disso, a presença de ligações insaturadas aumenta a suscetibilidade à oxidação, o que influencia a estabilidade e a qualidade do óleo (Salih; Salimon, 2021).

O ácido elaídico foi detectado apenas na hidrólise química, não sendo formado durante a hidrólise enzimática. Esse comportamento pode estar relacionado à seletividade e especificidade da RML, que hidrolisa e libera preferencialmente ácidos graxos com configuração *cis*, como o ácido oleico, destacando a estereosseletividade do sistema enzimático. Nesse contexto, Borgdorf e Warwel (1999) investigaram a seletividade de lipases, como a de *Mucor miehei* frente aos ácidos 9-octadenoicos nas configurações *cis/trans*, identificando que essas enzimas catalisam as reações muito mais rápido com ácido oleico (*cis*) do que com o ácido elaídico (*trans*).

Além disso, os resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo das lipases desempenham papel fundamental na seletividade da hidrólise enzimática, ao promoverem a clivagem da ligação éster (Bartlett *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2011). O microambiente catalítico formado por esses resíduos orienta o substrato e estabiliza o estado de transição da reação, ao mesmo tempo em que pode impedir rearranjos estruturais da cadeia carbônica, como a isomerização *cis/trans* (Mozhaev *et al.*, 1988; Assis *et al.*, 2010). Dessa forma, diferentemente da hidrólise química, a hidrólise enzimática com a lipase de *Rhizomucor miehei* não favoreceu a formação do ácido elaídico. Em concordância, Cheng *et al.* (2018) demonstraram, por meio de estudos experimentais e computacionais, que a isomerização do ácido oleico (*cis*) para seu isômero ácido elaídico (*trans*) é favorecida sob condições reacionais rigorosas, como a empregada na hidrólise química.

A Tabela 3 resume a composição de ácidos graxos obtida a partir da hidrólise enzimática e química utilizando óleo de canola. A hidrólise química resultou em um alto teor de ácido oleico (67,9%), seguido pelo ácido linoleico (18,6%), um perfil também observado na hidrólise enzimática. Esses resultados são consistentes com relatos da literatura que indicam que o óleo de canola é rico em ácidos oleico e linoleico (Biyouk *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2024).

Tabela 3.3 -Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de canola. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química

Compostos	Hidrólise enzimática			Hidrólise Química (%)
	Livre (%)	Lig-Mag_RML_0,5 (%)	Lig-Mag_RML_5 (%)	
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,13	0,18	0,21	-
Ácido palmítico (C16:0)	6,43	7,03	6,80	5,1
Ácido linoleico (C18:2)	20,25	21,46	22,09	18,6
Ácido oleico (C18:1)	68,8	66,22	65,09	67,9
Ácido esteárico (C18:0)	2,90	3,13	3,39	2,6
Ácido 11-eicosenóico (C20:1)	0,87	1,16	1,40	0,76
Ácido araquídico (C20:0)	0,50	0,62	0,75	0,46
Ácido elaídico (C18:1)	-	-	-	5,1

Fonte: Elaborado pela autora.

A hidrólise enzimática demonstrou seletividade, pois, além de produzir os principais ácidos graxos, permitiu a detecção de compostos minoritários, como o ácido palmitoleico. Em contraste, a hidrólise química levou à formação de ácido elaídico, provavelmente devido às condições de reação mais severas. Esses resultados estão de acordo com a literatura sobre a composição do óleo de canola, que é predominantemente formado por ácidos graxos monoinsaturados, especialmente o ácido oleico (Khattab *et al.*, 2012).

A Tabela 3.4 resume a composição de ácidos graxos obtida a partir da hidrólise do óleo de soja. A hidrólise química rendeu uma mistura com 49,43% de ácido linoléico e 33,16% de ácido oleico, enquanto a hidrólise enzimática produziu valores semelhantes, consistentes com dados da literatura que indicam que o óleo de soja é rico nesses ácidos graxos (Silva *et al.*, 2021).

Tabela 3.4 – Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de soja. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química

Composto	Hidrólise enzimática			Hidrólise Química (%)
	Livre (%)	Lig-Mag_RML_0,5 (%)	Lig-Mag_RML_5 (%)	
Ácido palmítico (C16:0)	13,38	13,88	13,53	11,98
Ácido linoleico (C18:2)	45,99	45,18	45,07	49,43
Ácido oleico (C18:1)	33,74	33,22	34,19	33,16
Ácido esteárico (C18:0)	6,11	6,59	6,20	5,44
Ácido 9-eicosenóico (C20:1)	0,16	0,23	0,22	-
Ácido araquídico (C20:0)	0,31	0,41	0,36	-
Ácido behênico (C22:0)	0,24	0,35	0,29	-

Fonte: Elaborado pela autora.

A Tabela 3.5 apresenta o perfil de ácidos graxos obtido a partir da hidrólise do óleo de girassol, mostrando 47,15% de ácido linoleico e 41,97% de ácido oleico para a hidrólise química, e valores semelhantes para a hidrólise enzimática (por exemplo, 45,24% usando a RML livre). Esses resultados são consistentes com a literatura, que relata o óleo de girassol como rico em ácidos linoleico e oleico (Khan *et al.*, 2022).

Tabela 3.5 – Composição percentual de ácidos graxos livres derivados do óleo de girassol. Hidrólise enzimática em comparação com a hidrólise química

Composto	Hidrólise enzimática			Hidrólise Química (%)
	Livre (%)	Lig-Mag_RML_0,5 (%)	Lig-Mag_RML_5 (%)	
Ácido palmítico (C16:0)	7,82	8,30	7,71	6,16
Ácido linoleico (C18:2)	45,24	43,73	42,44	47,15
Ácido oleico (C18:1)	40,58	40,98	42,84	41,97
Ácido esteárico (C18:0)	5,57	5,74	5,88	4,73
Ácido 9-eicosenóico (C20:1)	0,16	0,23	0,25	-
Ácido araquídico (C20:0)	0,20	0,26	0,20	-
Ácido behênico (C22:0)	0,43	0,64	0,54	-

Fonte: Elaborado pela autora.

De modo geral, os perfis de ácidos graxos obtidos por hidrólise enzimática e química são consistentes com a composição natural dos respectivos óleos vegetais, confirmando que ambos os processos recuperaram efetivamente os principais componentes. No entanto, a hidrólise enzimática demonstrou maior seletividade, particularmente por evitar a formação de compostos indesejáveis, como ácidos graxos trans (por exemplo, ácido elaídico), que podem ser gerados em condições químicas. Essas diferenças reforçam a influência do tipo de catalisador na qualidade do produto, além da eficiência de conversão e das vantagens em termos de seletividade e qualidade do produto, que são essenciais para aplicações de alto valor agregado.

Os ácidos graxos presentes nos óleos vegetais possuem uma diversidade de aplicações industriais. Nas indústrias alimentícia e cosmética (Ojha *et al.*, 2024; Kunik *et*

al., 2022), eles podem ser usados como ingredientes funcionais devido às suas propriedades nutricionais e físico-químicas. No setor de energia, esses ácidos são precursores valiosos para a produção de biodiesel e biolubrificantes (Filon, Anastopoulos e Karonis 2025; Monteiro *et al.*, 2024). Em particular, o elevado teor de ácidos oleico e linoleico torna estes produtos adequados para a síntese de biolubrificantes (Saka *et al.*, 2025), sendo a predominância de ácidos graxos insaturados particularmente vantajosa para a síntese de biolubrificantes devido à sua viscosidade favorável e propriedades em baixas temperaturas (Quinchia *et al.*, 2012), que são consideradas alternativas sustentáveis aos lubrificantes à base de petróleo (Cecilia *et al.*, 2020).

3.4 Conclusão

A produção de ácidos graxos a partir de óleos vegetais de canola, algodão, soja e girassol por meio de hidrólise enzimática tem se mostrado uma alternativa promissora aos processos convencionais. Este sistema demonstrou ser eficaz na produção de ácidos graxos livres, principalmente com óleos de algodão e canola, utilizando o biocatalisador Lig-Mag_RML_5, com percentuais de hidrólise de $68,2 \pm 0,5\%$ e $53,4 \pm 1,4\%$, respectivamente.

Além disso, o biocatalisador Lig-Mag_RML_0,5, preparado com uma baixa carga enzimática, apresentou desempenho comparável ao Lig-Mag_RML_5, indicando que a redução do uso de enzimas pode representar uma abordagem mais eficiente e econômica.

Ao comparar a composição de ácidos graxos livres obtidos por hidrólise química e enzimática, ambas produziram os principais ácidos graxos; no entanto, a hidrólise enzimática foi mais seletiva, evitando a formação de compostos indesejáveis e destacando a formação de outros compostos.

A utilização de enzimas imobilizadas no compósito Lig-Mag destaca-se pela sua simplicidade operacional, fácil recuperação do meio reacional por separação magnética e baixo custo de materiais. Esses resultados reforçam o potencial dos sistemas enzimáticos imobilizados como alternativas sustentáveis e seletivas para a produção de ácidos graxos a partir de matérias-primas renováveis.

CAPÍTULO 4**VALORIZAÇÃO DO ÓLEO FÚSEL PARA BIOSÍNTESE DE
BIOLUBRIFICANTES CATALISADA POR BIOCATALISADOR MAGNÉTICO
USANDO OS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DOS ÓLEOS DE ALGODÃO E
CANOLA****RESUMO**

Lubrificantes de origem biológica representam uma alternativa promissora aos lubrificantes convencionais derivados de fósseis, especialmente porque são derivados de materiais renováveis e apresentam maior biodegradabilidade e menor impacto ambiental. Assim, este estudo investigou a síntese de lubrificantes de origem biológica por um processo de duas etapas (hidroesterificação) que consiste em uma etapa de hidrólise química de óleos de canola e algodão, seguida pela reação de esterificação dos ácidos graxos livres (AGLs) com álcool fúsel simulado (AFS), um subproduto obtido de destilarias de bioetanol. Nesta etapa, a reação foi catalisada por um biocatalisador heterogêneo obtido pela imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em um suporte magnético de lignina extraída do bagaço de caju (Lig-Mag_CALB). O efeito de fatores relevantes (temperatura de reação e razão molar AGLs: AFS) e da forma do biocatalisador (CALB livre ou imobilizado) foi avaliado na etapa de esterificação. A porcentagem máxima de conversão de ésteres para ambas as fontes de AGLs em torno de 72–74% após 24 h de reação foi alcançada usando uma razão molar estequiométrica de ácido: álcool (1:1), 40 °C e 4% em peso de lipase imobilizada (Lig-Mag_CALB). Sob tais condições, os valores de produtividade para CALB imobilizada foram quase 2,5 vezes maiores do que os de sua forma solúvel para ambos os sistemas de reação. A lipase imobilizada (Lig-Mag_CALB) reteve cerca de 66,8% de conversão de ésteres após cinco lotes consecutivos de esterificação usando AGLs do óleo da semente de algodão e de 64,5% com os AGLs do óleo de canola. Além disso, também preservou 85% de sua atividade inicial após 27 dias de armazenamento a 4 °C. Os ésteres de fúsel resultantes exibiram propriedades físico-químicas promissoras como lubrificantes de base biológica. Esses resultados ressaltam o potencial do Lig-Mag_CALB como um biocatalisador eficiente, reutilizável e sustentável para a produção de ésteres fúsel a partir de óleos vegetais com propriedades lubrificantes interessantes.

Palavras-chave: matérias-primas renováveis; suporte à base de lignina; lipase imobilizada; biolubrificante; sustentabilidade.

4.1 Introdução

Lubrificantes são tipicamente formulados a partir de óleos minerais disponíveis comercialmente, sendo utilizados para mitigar o atrito e o desgaste entre superfícies deslizantes (Singh *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2024). Além disso, são capazes de minimizar a corrosão e dissipar calor (Kurre; Yadav, 2023). Essas características garantem o desempenho eficiente e a vida útil prolongada de equipamentos mecânicos (Oliveira *et al.*, 2024; Jafari *et al.*, 2024). No entanto, os lubrificantes convencionais são derivados do refino de petróleo bruto, um processo que, da extração ao descarte, está associado a impactos ambientais significativos (Pinheiro; Quina; Gando-Ferreira, 2020; Oliveira *et al.*, 2024).

A produção de biolubrificantes a partir de óleos vegetais surgiu como uma alternativa sustentável aos lubrificantes à base de petróleo (Pawar; Hulwan; Mandale, 2022). Esses biolubrificantes oferecem diversas propriedades favoráveis para aplicações de lubrificação, incluindo alta lubricidade, elevado índice de viscosidade, alta biodegradabilidade, baixa volatilidade e reduzido impacto ambiental (Sousa *et al.*, 2023; Carvalho *et al.*, 2024). Quimicamente, os biolubrificantes são principalmente ésteres de ácidos graxos derivados de óleos vegetais (Parente *et al.*, 2021; Appiah *et al.*, 2021; Monteiro *et al.*, 2024). Exemplos de matérias-primas empregadas na produção de biolubrificantes incluem os óleos alimentícios de canola e de algodão, que são ricos em ácidos graxos insaturados e possuem perfis composicionais distintos que os tornam atraentes tanto para aplicações alimentícias quanto industriais (Uppar; Dinesha; Kumar, 2022).

Para aumentar a eficiência da produção de biolubrificantes, a biocatálise tem sido extensivamente investigada (Bolina; Gomes; Mendes, 2021). Os processos enzimáticos requerem condições de reação mais brandas, são mais eficientes em termos energéticos e geram menos resíduos em comparação aos métodos químicos convencionais (Barbosa *et al.*, 2021; Sousa *et al.*, 2023; Mendes; Soares; Tardioli, 2022). Dentre as diversas classes de enzimas, as lipases se destacam por sua capacidade de catalisar reações envolvendo substratos insolúveis em água, incluindo a esterificação de

ácidos graxos livres (AGL) com álcoois ramificados em ésteres lubrificantes (Costantini; Califano, 2021; Monteiro *et al.*, 2023).

Em sistemas biocatalíticos, as enzimas podem ser utilizadas na forma livre ou imobilizada. No entanto, enzimas livres são frequentemente sensíveis a flutuações de temperatura e pH, e sua recuperação após a reação é difícil (Salgado; Santos; Vanetti, 2022). A imobilização melhora a estabilidade enzimática e permite a reutilização em múltiplos ciclos de reação, reduzindo assim os custos gerais do processo (Sampaio *et al.*, 2022). Consequentemente, o desenvolvimento de suportes de imobilização eficientes e econômicos é fundamental para a viabilidade industrial de processos enzimáticos (Souza *et al.*, 2016; Bolivar; Woodley; Fernandez-Lafuente, 2022).

Neste contexto, materiais lignocelulósicos, como o bagaço de caju (CAB), têm sido explorados como suportes promissores para imobilização enzimática. O CAB é predominantemente composto por celulose (17,7 - 20,1% m/m), hemicelulose (10,2 - 19,2% m/m) e lignina (33,6 - 35,3% m/m), exibindo propriedades físicas e mecânicas favoráveis, além de conter a presença de hidroxila fenólicos, hidroxila alifática, capazes de interagir com a enzima (Souza *et al.*, 2016; Silva *et al.*, 2018; Serpa *et al.*, 2021; Lima *et al.*, 2024; Levy *et al.*, 2025). O suporte magnético sintetizado pela combinação de lignina derivada de CAB com magnetita (Fe_3O_4) permite fácil recuperação do meio reacional devido ao seu comportamento superparamagnético. Este material compósito demonstra alta capacidade de imobilização, baixa toxicidade e promissor potencial de suporte catalítico. Ele tem sido utilizado para imobilizar a lipase B de *Candida antarctica* (CALB), como enzima modelo, e seu desempenho foi demonstrado em estudos anteriores (Serpa *et al.*, 2021; Girão Neto *et al.*, 2023; Levy *et al.*, 2025). Escolhido para este estudo em razão desse potencial.

A imobilização da CALB em um suporte magnético à base de lignina derivado do bagaço de caju foi imobilizada principalmente por ativação interfacial e adsorção hidrofóbica, conforme descrito por Girão *et al.* (2023). Testes de dessorção utilizando NaCl e Triton X-100 indicaram que a enzima não se ligou por meio de interações iônicas, mas sim por forças hidrofóbicas, com possível ligação covalente contribuindo para a atividade residual (Girão *et al.*, 2023). Da mesma forma, Serpa *et al.* (2021) relataram que a imobilização em compósitos magnéticos de lignina envolve interações multiponto, aumentando a estabilidade do biocatalisador e permitindo a recuperação magnética.

Dado seu potencial, avaliações adicionais deste biocatalisador magnético em outras aplicações são necessárias, especialmente em um sistema isento de solventes e de alta viscosidade, como o aqui avaliado, para a produção de biolubrificantes. Essas investigações podem fornecer informações adicionais sobre seu desempenho (ou seja, atividade em diferentes substratos e estabilidade em diferentes condições de reação).

Outro subproduto que desperta interesse na produção de biolubrificantes é o óleo fúsel, um resíduo gerado durante a separação do etanol em processos de destilação. O óleo fúsel é composto por uma mistura de álcoois, tendo o álcool isoamílico como componente majoritário, além de isobutanol, n-butanol, etanol e pequenas quantidades de água (Bôas *et al.*, 2021; Dogan; Özer; Erol, 2022). Dado seu alto teor alcoólico, o óleo fúsel é um substrato adequado para reações de esterificação (Tebas *et al.*, 2020), potencialmente levando à formação de misturas de ésteres com estruturas diversas e propriedades lubrificantes aprimoradas.

O óleo fúsel tem sido amplamente investigado na literatura científica devido ao seu potencial na produção de biolubrificantes. Mattos *et al.* (2023) utilizaram o óleo fúsel em combinação com o óleo de soja usado para a síntese de ésteres monoalquil epoxidados, obtendo resultados promissores. Da mesma forma, Bôas (2018) investigou o óleo fúsel na síntese do éster oleato de isoamila, obtendo propriedades físico-químicas que atenderam aos requisitos estabelecidos para biolubrificantes. Diante desses resultados, novos estudos envolvendo esse resíduo parecem relevantes, principalmente pelo seu potencial de agregar valor a um subproduto habitualmente descartado.

Assim, este estudo teve como objetivo avaliar o uso de CALB imobilizada em um suporte magnético derivado da lignina do bagaço de caju para a síntese de ésteres. As reações foram conduzidas em condições isentas de solventes, utilizando AGLs de óleos vegetais comerciais (canola e de algodão) e óleo fúsel sintético, sob diferentes parâmetros operacionais. Tal estratégia foi empregada para mimetizar o uso de óleos de cozinha residuais, que normalmente apresentam alto teor de AGLs e baixo custo. Como resultado, a sustentabilidade ambiental e a viabilidade econômica do bioprocessamento são aprimoradas. Além disso, a remoção do glicerol nas etapas de hidrólise reduz sua inibição competitiva no sítio ativo dos biocatalisadores. Os ésteres produzidos nas condições mais favoráveis foram caracterizados para avaliar sua adequação como biolubrificantes.

A novidade desta pesquisa reside na aplicação deste biocatalisador magnético em reações envolvendo óleos vegetais e óleo fúsel, uma abordagem não relatada anteriormente na literatura. Uma busca realizada no banco de dados Web of Science em

8 de junho de 2025 (abrangendo o período de 2015-2025) não resultou em estudos usando as palavras-chave “fusel oil” e “canola” ou “cottonseed oil”. Assim, este trabalho contribui para a valorização de resíduos agroindustriais, incluindo suportes magnéticos derivados de CAB e óleo fúsel, ao mesmo tempo em que avança a biocatálise e promove práticas industriais mais sustentáveis.

4.2 Metodologia

4.2.1 Materiais

O bagaço de caju (CAB) foi obtido de uma cooperativa localizada em Pacajus, Ceará, Brasil. A lipase B de *Candida antarctica* (CALB), com uma concentração de proteína de 8,5 mg mL⁻¹, e o *p*-nitrofenil butirato (*p*-NPB) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O ácido sulfúrico (98%), o cloreto de ferro (III) hexahidratado (97–100%), o hidróxido de sódio (98%), o hidróxido de amônio (24–26%) e o sulfato de ferro (II) heptahidratado (99%) foram fornecidos pela Dinâmica (São Paulo, SP, Brasil). Os óleos refinados de algodão (Elogiata, Juazeiro, BA, Brasil) e de canola (Liza, Ponta Grossa, PR, Brasil) foram adquiridos no mercado local (Fortaleza, CE, Brasil). Os álcoois usados para preparar o SFA eram de grau analítico adquiridos da Sigma-Aldrich. Todos os outros reagentes utilizados também foram de grau analítico fornecidos pela Synth Ltda. (São Paulo, SO, Brasil).

Neste estudo, o AFS foi preparado pela mistura dos seguintes álcoois nas proporções relatadas por Dias *et al.* (2021): 79,65% (v/v) álcool isoamílico, 9,69% (v/v) isobutanol, 4,52% (v/v) butanol, 3,98% (v/v) propanol e 2,15% (v/v) etanol.

4.2.2 Método

4.2.2.1 Extração da lignina do bagaço de caju

A lignina foi extraída do CAB seguindo o protocolo descrito por Serpa *et al.*, (2021). A matéria-prima foi inicialmente lavada e seca em estufa a 60 °C por 24 h. Em seguida, foi submetida a tratamento ácido com ácido sulfúrico 0,6 mol·L⁻¹ (H₂SO₄), seguido de tratamento alcalino usando hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol·L⁻¹. O filtrado resultante da etapa alcalina foi acidificado com ácido sulfúrico 72% (v/v) e deixado em repouso por 12 h para permitir a precipitação da lignina. A lignina precipitada foi recuperada por centrifugação a 4500 rpm e 4 °C por 15 min. O produto final de lignina

foi então seco em estufa a 60 °C por mais 24 h. O rendimento da extração foi de 0,22 g de lignina por grama de CAB seco, o que corresponde a uma eficiência de aproximadamente 62,34%, considerando que a lignina compreende cerca de 33,6–35,3% da massa de CAB Rocha *et al.*, (2014).

O cálculo do rendimento de extração da lignina foi descrito no (*Capítulo 3*) Tópico 3.2.2.1.

4.2.1.2 Preparação do compósito lignina-magnetita

A preparação do compósito lignina-magnetita foi realizada de acordo com a metodologia relatada por Serpa *et al.*, (2021). Hexahidrato de cloreto de ferro (III) ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) e heptahidrato de sulfato de ferro (II) ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos separadamente em água ultrapura em concentrações de 38,4% (p/v) e 19,8% (p/v), respectivamente. Paralelamente, a água ultrapura foi acidificada com ácido clorídrico (HCl) a 5% (v/v), e as soluções de sais de ferro foram adicionadas ao meio acidificado. Simultaneamente, 0,6 g de lignina foi disperso em 15 mL de solução de hidróxido de amônio a 30% (p/v). A mistura contendo os sais de ferro e lignina foi sonicada por 15 min. Finalmente, o material foi deixado para secar à temperatura ambiente (25 °C). O suporte magnético resultante foi designado como Lig-Mag. A quantidade total de compósito lignina-magnetita (Lig-Mag) obtida foi de 1,35 g de compósito por grama de lignina .

O cálculo do rendimento de extração da lignina foi descrito no (*Capítulo 3*) Tópico 3.2.2.1.

4.2.1.3 Imobilização da lipase B de *Candida antarctica* no Lig-Mag

A CALB foi imobilizada no suporte Lig-Mag com uma carga proteica máxima de 5 mg de proteína por g de suporte (devido ter apresentado boa atividade catalítica em estudos realizados pelo grupo de pesquisa), utilizando tampão fosfato de sódio 5 mM (pH 7,0), seguindo a metodologia descrita por Girão Neto *et al.* (2023). A imobilização foi conduzida a 25 °C sob agitação contínua em homogeneizador rotativo por 24 h. Após o período de incubação, o biocatalisador (denominado Lig-Mag_CALB) foi recuperado por filtração a vácuo e lavado com tampão fosfato de sódio 25 mM (pH

7,0). O sobrenadante do processo de imobilização foi retirado para análise, conforme descrito por Girão Neto *et al.* (2023).

4.2.1.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi avaliada com base na hidrólise de ρ -NPB, com absorbância medida a 348 nm usando um espectrofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), seguindo os protocolos de Tsujita, Ninomiya e Okuda (1989) e Girão Neto *et al.* (2023). Para a enzima livre e sobrenadantes pós-imobilização, foram utilizados 12,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0), 250 μ L de ρ -NPB e 250 μ L do respectivo sobrenadante, e a mistura foi agitada a 1000 rpm a 25 °C. Para o biocatalisador imobilizado, 0,01 g do material foi adicionado a 12,75 mL de tampão e 250 μ L de ρ -NPB, sob condições de reação idênticas. As atividades específicas da enzima livre, do sobrenadante e do catalisador imobilizado foram determinadas, permitindo a avaliação da retenção da atividade, eficiência de imobilização e rendimento (Bradford 1976; Baltierra *et al.*, 2015).

O cálculo para determinação da atividade enzimática foi descrito no (*Capítulo 3*) Tópico 3.2.2.3.

4.2.1.5 Hidrólise química de óleos vegetais e caracterização de ácidos graxos livres

A hidrólise química dos óleos de canola e de algodão foi realizada com base no método descrito por Bart, Palmeri e Cavallaro (2010), com modificações. O processo foi iniciado utilizando uma concentração de 30,7% (m/v) do óleo vegetal, solução aquosa de NaOH ($2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$) correspondendo a 55,4% (v/v) da mistura reacional e 13,9% (v/v) de etanol com concentração 95% (v/v) (para solubilização dos triglicerídeos), sob temperatura de 50 °C, agitação mecânica de 150 rpm e tempo de 24 h. Após esse período, foi adicionado 11,8% (v/v) de HCl concentrado à mistura, que então foi mantida nas mesmas condições por mais 1h. Este procedimento foi conduzido separadamente para cada óleo.

A obtenção dos ácidos graxos livres (AGL) foi monitorada por titulação ácido-base seguindo o método Ca 5a-40 (AOCS, 1998). A porcentagem de hidrólise foi calculada utilizando a Equação 1.

$$\text{Hidrólise (\%)} = \left(\frac{V \times M_{\text{NaOH}} \times MM_{\text{ácidos graxos}}}{m \times f} \right) \times 100 \quad (1)$$

em que V representa o volume em mL de NaOH ($0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) consumido durante a titulação; M_{NaOH} é a concentração da solução de NaOH; $MM_{\text{ácidos graxos}}$ é a massa molar média dos AGLs ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$); m é a massa da amostra utilizada na titulação (g); e f é a fração de óleo utilizada.

Para identificar os AGLs liberados, eles foram convertidos em seus respectivos ésteres metílicos, de acordo com o método descrito por Levy *et al.* (2025). Primeiramente, 100 mg dos AGLs (dos óleos de canola e de algodão, separadamente) foram dissolvidos em 3 mL de hexano. Em seguida, 4 mL de NaOH ($0,5 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em metanol foram adicionados e a mistura foi aquecida a $70 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o resfriamento, foram adicionados 5 mL de uma solução contendo 3,3% (m/v) de NH_4Cl em metanol e H_2SO_4 concentrado. As misturas foram agitadas, reaquecidas, resfriadas novamente e, em seguida, receberam 4 mL de solução saturada de NaCl. Após nova agitação, foram adicionados 3 mL de hexano, seguido por uma etapa final de agitação.

A metodologia empregada para a identificação dos ácidos graxos formados a partir da hidrólise dos triglicerídeos dos óleos vegetais, bem como sua análise por cromatografia gasosa foi descrita no (Capítulo 3) Tópico 3.2.2.7.

4.2.1.6 Produção de lubrificantes de origem biológica por meio de reações de esterificação enzimática: Avaliando a influência de parâmetros relevantes

Os experimentos de reação de esterificação foram baseados em Serpa *et al.*, (2021) e Levy *et al.*, (2025), com adaptações, utilizando ácidos graxos livres (AGL) obtidos de óleos vegetais (canola ou de algodão) e álcool fúsel simulado como matérias-primas. Esses testes foram realizados em frascos fechados com capacidade de 125 mL contendo quantidades apropriadas de matéria-prima (10 mL de misturas reacionais na ausência de qualquer solvente orgânico) imersos em um agitador termostático de banho-maria sob agitação constante (150 rpm). As razões molares AGL:AFS avaliadas foram 1:1 e 1:3, e as reações foram conduzidas a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e $50 \text{ }^\circ\text{C}$ em até 48 horas de contato. A carga enzimática utilizada nesses testes foi fixada em 4% (m/v) para CALB livre e imobilizado, o que corresponde a 0,17 mg e 0,06 mg de proteína por mL de mistura reacional, respectivamente. Adicionalmente, os cursos de reação foram avaliados utilizando a forma livre da enzima. Amostras da mistura de reação (volume de cada

amostra) foram retiradas periodicamente para determinação da concentração residual de AGLs por titulação ácido-base, de acordo com o método padrão de Ca 5a-40 (AOCS, 1998) e, assim, a porcentagem de conversão de AGLs foi determinada pela Equação 2.

$$\text{Conversão (\%)} = \left(\frac{IA_0 - IA}{IA_0} \right) \times 100 \quad (2)$$

onde IA_0 é o valor de acidez inicial (mg NaOH/g) antes da reação de esterificação, e IA é o valor de acidez final (mg NaOH/g) após a reação.

A produtividade ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg proteína}^{-1}$), um parâmetro que expressa a quantidade de proteína necessária para converter uma determinada concentração de AGL em ésteres fúsel por minuto de reação no equilíbrio, foi calculada de acordo com a Equação 3,

$$\text{Produtividade} = \left(\frac{AGL_0 \times C}{t_e \times m_{\text{proteína}}} \right) \quad (3)$$

em que AGL_0 é a quantidade inicial de ácidos em cada mistura de reação (μmol), C é a porcentagem experimental de conversão de AGL_0 no equilíbrio (%), t_e é o tempo de reação no equilíbrio (min) e $m_{\text{proteína}}$ é a quantidade de proteína em cada mistura de reação (0,17 mg ou 0,06 mg de proteína por mL de volume de reação para CALB livre e imobilizado).

4.2.1.7 Estabilidade operacional e de armazenamento do biocatalisador Lig-Mag_CALB

Para avaliar a estabilidade operacional do biocatalisador, após a reação de esterificação em condições ótimas, o Lig-Mag_CALB foi recuperado por separação magnética e lavado com hexano na proporção de 8% (m/v). Uma nova reação de esterificação foi então iniciada utilizando o mesmo biocatalisador. Este procedimento foi repetido por cinco ciclos reacionais consecutivos.

Para a avaliação da estabilidade de armazenamento, o Lig-Mag_CALB foi armazenado a 4 °C e sua atividade catalítica foi monitorada por um período de 27 dias. A atividade enzimática foi determinada conforme descrito no (Capítulo 3) Tópico 3.2.2.3.

4.2.1.8 Separação parcial dos lubrificantes de base biológica resultantes

Os biolubrificantes obtidos de ambos os óleos vegetais em condições ótimas de reação foram submetidos a 100 °C por 3 h para remover a água e os álcoois não reagidos. Em seguida, a mistura de ésteres foi submetida à caracterização físico-química.

4.2.1.9 Caracterização dos lubrificantes de base biológica resultantes

A viscosidade cinemática e a densidade das amostras de biolubrificantes foram medidas utilizando um Viscosímetro Anton Paar SVM 3000 Stabinger (Anton Paar, Graz, Áustria). As medições de viscosidade foram realizadas a 40 °C e 100 °C, e o índice de viscosidade foi calculado de acordo com o método ASTM D2270. O índice de acidez dos biolubrificantes foi determinado seguindo o método Ca 5a-40 (AOCS, 1998).

A estabilidade oxidativa foi avaliada utilizando o método Rancimat em um analisador Rancimat Professional Biodiesel (Metrohm 893, Herisau, Suíça), em conformidade com a norma EN 14112 (ES14112, 2020).

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Imobilização da lipase B de *Candida antarctica* em suporte Lig-Mag

A Tabela 4.1 apresenta os parâmetros relacionados à imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) em suporte Lig-Mag. O rendimento de imobilização atingiu $60,59 \pm 2,6\%$, com uma eficiência de imobilização de $12,98 \pm 1,3\%$. A atividade específica do biocatalisador resultante (Lig-Mag_CALB) foi de 11,87 U/g, comparável aos valores relatados por Girão Neto *et al.* (2023), que também investigaram a imobilização de CALB utilizando o mesmo suporte.

Tabela 4.1 – Parâmetros de imobilização de CALB em suporte Lig-Mag

Rendimento (%)	Eficiência (%)	Atividade oferecida (U/g de suporte)	Atividade do biocatalisador (U/g de suporte)
$60,59 \pm 2,6$	$12,98 \pm 1,3$	$150,21 \pm 0,8$	$11,87 \pm 1,8$

Fonte: Elaborada pela autora.

4.3.2 Hidrólise química de óleos vegetais de canola e algodão

A hidrólise de triglicerídeos dos óleos de algodão e canola resultou em rendimentos de ácidos graxos livres (AGL) de 62,2% e 70,6%, respectivamente. Os perfis

de AGL obtidos a partir dessas reações, determinados por CG-EM, estão resumidos na Tabela 4.2. Para o óleo de algodão, os principais ácidos graxos identificados foram: ácido linoleico (49,6%), ácido palmítico (25,7%) e ácido oleico (19,7%). Em contraste, o óleo de canola apresentou alto teor de ácido oleico (67,9%), seguido pelo ácido linoleico (18,6%).

Tabela 4.2 – Composição percentual de ácidos graxos livres derivados dos óleos de algodão e canola

Ácidos graxos livres	Composição (% m/m)	
	Óleo de algodão	Óleo de canola
Ácido palmítico	25,7 ± 1,1	5,1 ± 0,0
Ácido linoleico	49,6 ± 1,1	18,6 ± 0,0
Ácido oleico	19,7 ± 0,2	67,9 ± 0,0
Ácido eláídico	2,1 ± 0,0	5,1 ± 0,1
Ácido esteárico	2,9 ± 0,2	2,6 ± 0,1

Fonte: Elaborado pela autora.

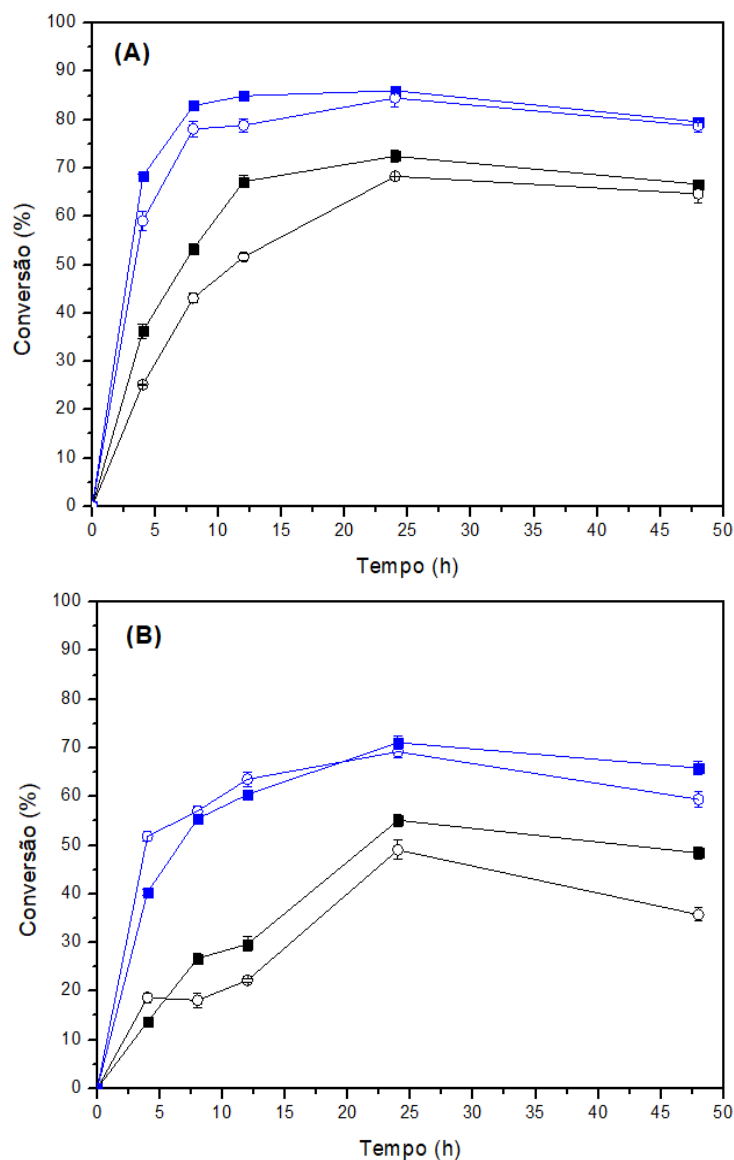
Em termos de estado físico, os AGL derivados do óleo de semente de algodão solidificaram à temperatura ambiente (25 °C), enquanto os do óleo de canola permaneceram na fase líquida. Essa diferença pode ser atribuída às composições de AGL. De acordo com Thompson *et al.* (2019), o óleo de semente de algodão normalmente contém proporções mais altas de ácido linoleico (50–60%) e ácido palmítico (22–26%). O ácido palmítico é um ácido graxo saturado de cadeia longa com um ponto de fusão relativamente alto (63 °C), o que contribui para seu estado sólido à temperatura ambiente (Qin *et al.*, 2023). Por outro lado, a alta concentração de ácido oleico (67,90%) no óleo de canola, um ácido graxo monoinsaturado com um ponto de fusão mais baixo, ajuda a manter seu estado líquido a 25 °C. Em geral, a composição de AGL do óleo de canola é predominantemente insaturada, o que explica esse comportamento (Zdziennicka *et al.*, 2019). A diferente acessibilidade dos AGLs aos sítios ativos do CALB imobilizada pode afetar sua seletividade e desempenho catalítico. Além disso, essa composição distinta de ácidos graxos também pode influenciar as propriedades físico-químicas e/ou tribológicas dos ésteres de lubrificantes de origem biológica resultantes (Bolina; Gomes; Mendes, 2021; Reeves *et al.*, 2015; Ribeiro Filho; Santos, 2025).

4.3.3 Influência da temperatura e da razão molar na reação de esterificação

Neste conjunto de experimentos, a influência de fatores relevantes como temperatura de reação (de 40 °C a 50 °C) e razão molar ácido: álcool (de 1:1 a 1:3) na reação foi sistematicamente avaliada para ambas as fontes de ácidos. Esses testes foram conduzidos para determinar as melhores condições experimentais para a reação de esterificação enzimática. Os níveis para cada variável foram escolhidos com base em estudos anteriores realizados em nosso grupo de pesquisa para produção de ésteres enzimáticos usando CALB como modelo de lipase (Serpa *et al.*, 2021; Levy *et al.*, 2025; Girão Neto *et al.*, 2023). Esses testes foram conduzidos usando volume de reação inicial fixo (10 mL), frequência de agitação (150 rpm) e proporção de biocatalisador (4% (m/v) para ambas as formas de biocatalisador que correspondem a 0,17 mg e 0,06 mg de proteína por mL de mistura de reação, respectivamente). O progresso da produção de ésteres usando os ácidos dos óleos de semente de algodão e canola é resumido na Fig. 4.1 e Fig. 4.2, respectivamente.

A Figura 4.1 apresenta os perfis de conversão em ésteres utilizando AGLs do óleo de algodão após 48 h a 40 °C (Fig. 4.1A) e 50 °C (Fig. 4.1B). De acordo com esses resultados, os maiores valores percentuais de conversão de AGLs foram obtidos utilizando uma razão molar estequiométrica de AGLs: álcool (1:1) para ambas as formas do biocatalisador – CALB livre ($86,0 \pm 0,1\%$ após 12 h de reação) e CALB imobilizado ($72,4 \pm 1,3\%$ após 24 h de reação) a 40 °C (Fig. 4.1A). Esses resultados demonstram claramente o mais alto desempenho catalítico da CALB livre, devido à sua alta carga proteica inicial, sendo quase três vezes maior do que a de sua forma imobilizada (0,17 mg e 0,06 mg de proteína inicial por mL de mistura de reação).

Figura 4.1- Perfis de conversão de ésteres a partir do óleo da semente de algodão e álcool (óleo fúsel) a 40 °C (A) e 50 °C (B) sob diferentes proporções molares de ácido: álcool catalisados por CALB livre (símbolos azuis, (■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3) e Lig-Mag_CALB (símbolos pretos, (■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3)



Fonte: Elaborado pela autora.

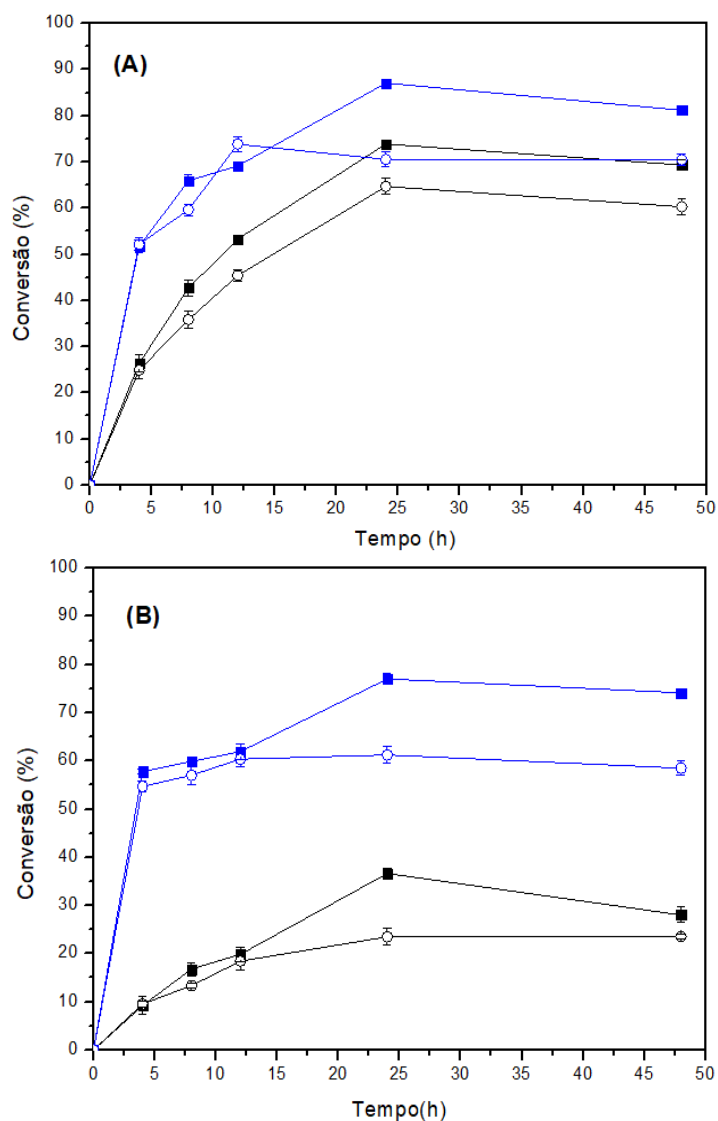
Por outro lado, uma ligeira diminuição na porcentagem de conversão de AGL foi observada usando um excesso de álcool na mistura de reação (AGL: álcool de 1:3) – ver Figura 4.1 (A, B). Esses resultados demonstram claramente que o processo de esterificação enzimática utilizando ambas as formas de biocatalisadores foi favorecido em uma razão molar estequiométrica. Neste caso, um excesso de álcool pode reduzir a

concentração inicial de AGL na mistura reacional (efeito de diluição), resultando em uma menor conversão de AGL (produção de ésteres). Além disso, reações de esterificação conduzidas em estequiométricas também podem reduzir os custos e a complexidade das estratégias de recuperação dos ésteres resultantes ao final do processo catalítico. Estes resultados demonstram o papel crucial que o excesso de álcool desempenha na reação utilizando ambas as formas de biocatalisadores. Conforme destacado por Simão Neto *et al.*, (2025), o alto excesso de álcool na mistura reacional para a produção enzimática de ésteres 2-etil hexílicos a partir de óleos resultou em uma queda acentuada no desempenho catalítico da lipase Eversa® Transform 2.0 devido à possível remoção de sua camada de hidratação essencial, o que pode levar à sua inativação.

A 50 °C (Fig. 4.1B), a maior porcentagem de conversão de ácidos para CALB livre foi de cerca de 70%, utilizando-se ambas as razões molares ácido: álcool. Por outro lado, a lipase imobilizada (Lig-Mag_CALB) atingiu uma conversão de ésteres de apenas $55,1 \pm 1,2\%$ após 24 h de reação. O desempenho superior da enzima livre provavelmente se deve à maior acessibilidade ao substrato e à maior atividade catalítica inicial em comparação com sua forma imobilizada. A presença de agentes conservantes em sua formulação, como polióis e sais, pode reduzir possíveis distorções de sua atividade original (Persson *et al.*, 2002).

A Figura 4.2 apresenta o perfil de conversão usando ácidos do óleo de canola como matéria-prima, sob as mesmas temperaturas avaliadas para óleo da semente de algodão, descritas acima.

Figura 4.2 - Perfis de Conversão para reações de esterificação usando ácido de canola e álcool (óleo fúsel) a 40 °C (A) e 50 °C (B) sob diferentes proporções molares de ácido: álcool catalisadas por CALB livre (símbolos azuis, (■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3) e Lig-Mag_CALB (símbolos pretos, (■) proporção molar de 1:1; (○) proporção molar de 1:3)



Fonte: Elaborado pela autora.

Os resultados na Fig. 4.2 demonstram que os maiores valores percentuais de conversão de ésteres também foram alcançados a 40 °C. De acordo com a Fig. 4.2 A, os maiores valores percentuais de conversão de ésteres de $87,1 \pm 0,1\%$ (para CALB livre) e $73,9 \pm 0,6\%$ (para Lig-Mag_CALB) foram alcançados em 24 h de reação realizada a 40 °C e razão molar ácido: álcool de 1:1. Esses valores foram muito semelhantes aos

obtidos usando os ácidos do óleo da semente de algodão. Como esperado, uma diminuição do desempenho catalítico a 50 °C também foi observada (ver Fig. 4.2 B), demonstrando assim a inativação térmica da enzima. Esses resultados mostram também uma ligeira diminuição da eficiência catalítica da enzima usando um excesso de álcool, de acordo com os resultados obtidos para o óleo de algodão.

A análise comparativa de ambas as temperaturas revelou que a produção de éster foi maximizada a 40 °C. Embora o aumento da temperatura possa aumentar as taxas de reação, melhorando a difusão do substrato para o sítio ativo, o aquecimento excessivo pode desestabilizar ou desnaturar a enzima, reduzindo seu desempenho catalítico ao longo do tempo (Zdarta *et al.*, 2016).

Os resultados experimentais para a conversão enzimática de AGL obtidos no equilíbrio (ver Figuras 4.1 e 4.2) usando ambas as formas de lipase (CALB livre ou imobilizada) são apresentados na Tabela 4.3, juntamente com os valores de produtividade calculados para os diferentes sistemas de reação avaliados neste estudo. Embora a quantidade inicial de proteína para CALB livre tenha sido quase três vezes maior do que sua forma imobilizada (0,17 e 0,06 mg de proteína por mL de mistura de reação – Seção 4.2.1.5 em Materiais e Métodos), os maiores valores de produtividade foram obtidos usando Lig-Mag_CALB (lipase imobilizada) como biocatalisador. Para o óleo de algodão, a produtividade máxima foi de $40,7 \pm 0,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ – quase 2,5 vezes maior do que sua forma livre (apenas $17,0 \pm 0,8 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$). Os valores de produtividade para o óleo de canola apresentaram a mesma tendência (Tabela 4.3), porém esses valores foram duas vezes menores que os obtidos para os ácidos do óleo de algodão – $20,4 \pm 0,3 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ e $9,3 \pm 0,7 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ para Lig-Mag_CALB e CALB livre, respectivamente.

Esses resultados podem ser explicados por uma possível melhora dos efeitos de partição e difusão das matérias-primas hidrofóbicas (ácidos e álcoois para ésteres) para o microambiente do biocatalisador preparado usando um suporte de material hidrofóbico (material de lignina magnética, Lig-Mag). Esses dados demonstram claramente que o processo de imobilização usando um suporte de material adequado, neste caso material derivado de lignina, pode estabilizar a enzima via mecanismo de ativação interfacial e resultar em uma partição alta e satisfatória de matérias-primas hidrofóbicas para seus microambientes externo/interno. Resultados semelhantes também foram observados em estudos anteriores para a produção enzimática de ésteres valiosos usando várias lipases imobilizadas em suportes hidrofóbicos Levy *et al.* (2025) a; Levy

et al. (2025) b. Portanto, estudos subsequentes como testes de estabilidade operacional foram realizados usando apenas a lipase imobilizada.

Esses resultados demonstraram também que o CALB apresentou melhor desempenho catalítico, com base nos valores de produtividade resumidos na Tabela 4.3, utilizando AGLs do óleo da semente de algodão. Isso sugere que o biocatalisador apresenta maior afinidade pelo perfil de ácidos graxos do óleo da semente de algodão, aprimorando seu desempenho catalítico. A diferença pode ser atribuída às distintas composições de ácidos graxos: o óleo de semente de algodão continha ácido linoleico (49,6%), ácido palmítico (25,7%) e ácido oleico (19,7%), enquanto o óleo de canola era predominantemente composto de ácido oleico (67,9%), seguido de ácido linoleico (18,6%). O maior teor de ácido linoleico no óleo de semente de algodão pode ter melhorado a eficiência da reação, já que sua estrutura poli-insaturada (C18:2, $\Delta 9,12$) proporciona maior flexibilidade conformacional em comparação ao ácido oleico monoinsaturado (C18:1, $\Delta 9$), facilitando potencialmente o alinhamento ideal dentro do sítio ativo do CALB (Uppenberg *et al.*, 1994).

A CALB apresenta um sítio ativo estreito em forma de túnel, composto pela tríade catalítica Ser105-His224-Asp187, circundado por resíduos hidrofóbicos que favorecem a ligação a substratos apolares (Uppenberg *et al.*, 1994; Pleiss *et al.*, 1998). Sua geometria rígida restringe o acesso a substratos volumosos ou altamente ramificados. Estudos estruturais mostram que a CALB é mais ativa com moléculas lineares ou menos estericamente impedidas, como ácidos graxos saturados ou poli-insaturados com ligações duplas distais (Uppenberg *et al.*, 1994). Nesse contexto, a presença significativa de ácido palmítico (C16:0) no óleo de algodão também pode contribuir para maiores taxas de conversão, uma vez que substratos saturados de cadeia curta são mais facilmente acomodados no sítio ativo da enzima (Hasan *et al.*, 2006).

Portanto, esses resultados indicam que o uso de óleos com altos níveis de ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico) em sua composição, como óleos de soja refinados ou usados, podem ser considerados matérias-primas promissoras para a produção enzimática de ésteres valiosos com propriedades lubrificantes.

Tabela 4.3 – Influência das fontes de ácidos graxos livres (AGLs), das condições experimentais e da forma do biocatalisador (CALB livre ou imobilizado) na produção ésteres com o óleo fúsel por esterificação de ácidos graxos em sistemas sem solvente

Condições				Parâmetros			
Fonte de AGL	Forma do biocatalisador	Temperatura	Razão molar (AGL:AFS)	AGL (μmol)	Conversão (%)	Tempo reacional (min)	Produtividade ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)
Algodão	CALB	40 °C	1:1	24.173,3	86,0 ± 0,1	720	17,0 ± 0,8
			1:3	16.115,5	84,5 ± 1,8	720	11,1 ± 0,4
		50 °C	1:1	24.173,3	71,1 ± 1,2	1440	7,0 ± 1,4
			1:3	16.115,5	70,2 ± 3,3	1440	4,6 ± 1,8
	Lig-Mag_CALB	40 °C	1:1	23.816,7	73,9 ± 0,6	720	40,7 ± 0,7
			1:3	16.198,4	67,3 ± 2,1	1440	12,6 ± 0,7
		50 °C	1:1	24.173,3	55,1 ± 1,2	1440	15,4 ± 1,4
			1:3	16.115,5	49,1 ± 1,9	1440	9,2 ± 1,3
Canola	CALB	40 °C	1:1	23.816,7	87,1 ± 0,1	1440	8,5 ± 0,9
			1:3	16.198,4	70,5 ± 3,6	720	9,3 ± 0,7
		50 °C	1:1	23.816,7	77,0 ± 1,2	1440	7,5 ± 1,4
			1:3	16.198,4	61,3 ± 1,7	720	8,1 ± 1,1
	Lig-Mag_CALB	40 °C	1:1	23.816,7	73,9 ± 0,6	1440	20,4 ± 0,3
			1:3	16.198,4	67,3 ± 2,1	1440	12,6 ± 1,4
		50 °C	1:1	23.816,7	40,0 ± 1,0	1440	11,0 ± 1,5
			1:3	16.198,4	23,5 ± 1,6	1440	4,4 ± 1,8

Fonte: Elaborada pela autora.

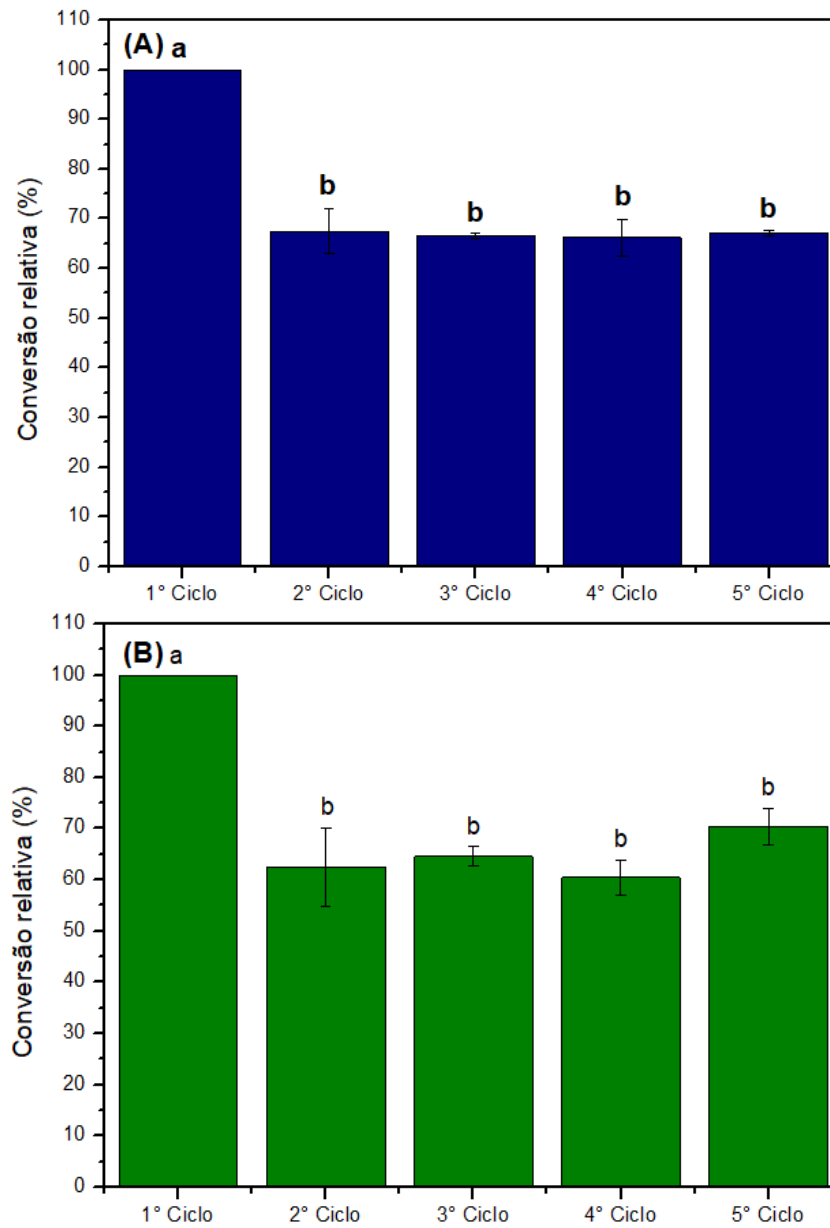
4.3.4 Estabilidade operacional e de armazenamento do biocatalisador Lig-Mag_CALB

Sob as condições ótimas estabelecidas para a produção de ésteres, considerando a razão molar ácido: álcool, temperatura e tempo de reação, a estabilidade operacional do biocatalisador Lig-Mag_CALB foi avaliada ao longo de cinco ciclos consecutivos de esterificação. Após cada ciclo, a enzima imobilizada foi separada por ação de um campo magnético (ímã), lavada com hexano e reutilizada em novos ciclos reacionais.

Os resultados das reações utilizando os AGLs do óleo de algodão são mostrados na Figura 4.3A. Observou-se uma redução de 32,5% na conversão entre o primeiro e o segundo ciclo, seguida por uma constância dos valores nos ciclos seguintes, comprovada pela análise de estatística, mostrando que não tem diferenças significativas. A perda mais significativa na atividade catalítica ocorreu do primeiro ciclo ao segundo, após o qual a conversão permaneceu relativamente estável. Esse comportamento pode ter ocorrido devido a desnaturação parcial da enzima ou a alterações conformacionais na interface enzima-suporte, seguidas pela estabilização dos sítios ativos remanescentes.

Uma tendência semelhante foi observada para as reações envolvendo os AGLs do óleo de canola (Fig. 4.3B). Nesse caso, a queda na conversão entre o primeiro e o segundo ciclo foi de 37,5%. Esse declínio pode ser atribuído a possível dessorção da enzima. Embora a etapa de lavagem seja essencial para a remoção de substratos e produtos residuais, ela também pode impor estresse estrutural ao biocatalisador, contribuindo para a perda da eficiência enzimática. Estudos anteriores envolvendo lipases imobilizadas relataram desafios semelhantes, particularmente em sistemas com fases apolares e elevada produção de água durante a esterificação (Barbosa *et al.*, 2015). No entanto, quando se utilizam solventes apolares, como o hexano, a CALB tende a manter sua atividade, uma vez que o solvente impede a formação de aglomerados de água, o que pode ter contribuído para a taxa de conversão observada ao longo dos ciclos (Banik *et al.*, 2016).

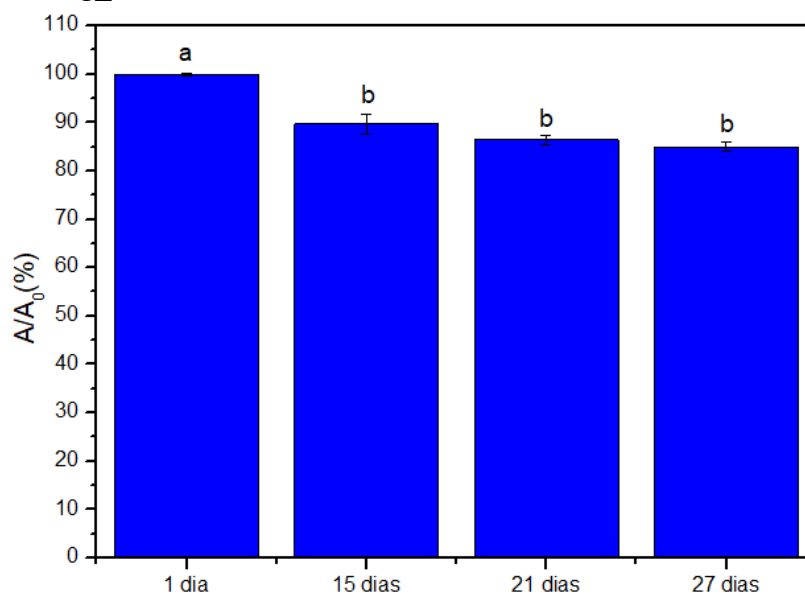
Figura 4.3 - Conversão relativa ao longo de ciclos reacionais sucessivos utilizando o biocatalisador Lig-Mag_CALB, com ácidos graxos derivados de óleos de algodão (A) e canola (B), a 40 °C e uma razão molar ácido:álcool de 1:1, utilizando óleo fúsel como fonte de álcool



Fonte: Elaborado pela autora.

A Figura 4.4 apresenta a atividade residual do biocatalisador Lig-Mag_CALB imediatamente após a preparação e ao longo de 27 dias de armazenamento a 4 °C. O biocatalisador reteve $91,1 \pm 1,0\%$ de sua atividade hidrolítica inicial após 15 dias, $87,1 \pm 1,3\%$ após 21 dias e $85,7 \pm 0,8\%$ ao final dos 27 dias de armazenamento. Este alto nível de estabilidade reflete a preservação eficaz da estrutura tridimensional da enzima e a integridade do sistema de imobilização no suporte magnético, mesmo sob refrigeração prolongada. A retenção de mais de 85% de sua atividade catalítica original (expressa na hidrólise de ρ -NPB) sugere que o biocatalisador pode ser preparado com antecedência e armazenado por pelo menos quatro semanas sem a necessidade de reativação ou processamento adicional, uma vantagem em termos de logística e eficiência operacional em bioprocessos contínuos e em batelada.

Figura 4.4 - Atividade catalítica relativa do biocatalisador Lig-Mag_CALB durante armazenamento a 4 °C



Fonte: Elaborado pela autora.

Esses resultados foram consistentes com um estudo anterior relatado por Girão Neto *et al.* (2023), que também observou apenas uma ligeira diminuição na atividade enzimática deste biocatalisador (Lig-Mag_CALB) após 15 dias de armazenamento. Esses achados destacam o potencial do biocatalisador Lig-Mag_CALB não apenas para uso repetido (testes de estabilidade operacional - reuso), mas também para armazenamento confiável e uso sob demanda, fatores-chave para sua aplicabilidade industrial em processos biocatalíticos.

4.3.5 Parâmetros físico-químicos de ácidos graxos e biolubrificantes

As propriedades físico-químicas dos ésteres produzidos a partir de óleos da semente de algodão e canola foram determinadas de acordo com métodos padrão. A Tabela 4.4 mostra a massa específica, a viscosidade cinemática, o índice de viscosidade e o índice de acidez dos ésteres obtidos.

Tabela 4.4 – Propriedades físico-químicas dos ésteres produzidos enzimaticamente usando AGLs de óleos da semente de algodão e canola e álcool fúsel sintético

Parâmetros	Ésteres alquílicos	Ésteres alquílicos
	de óleo de semente de algodão	de óleo de semente de canola
Índice de acidez (mg NaOH/g)	0,86 ± 0,1	0,67 ± 0,3
Estabilidade oxidativa (h)	0,55 ± 0,0	1,01 ± 0,1
Massa específica 40 °C (g/cm ³)	0,91 ± 0,2	0,88 ± 0,3
Massa específica 100 °C (g/cm ³)	0,84 ± 0,1	0,84 ± 0,1
Viscosidade cinemática 40 °C (mm ² /s)	26,5 ± 0,1	13,17 ± 0,3
Viscosidade cinemática 100 °C (mm ² /s)	5,19 ± 0,1	3,33 ± 0,2
Índice de viscosidade	131,41 ± 0,1	127,23 ± 0,2

Fonte: Elaborado pela autora.

As viscosidades e densidades cinemáticas dos biolubrificantes foram maiores a 40 °C do que a 100 °C. Essa tendência é esperada, visto que o aumento da temperatura intensifica o movimento molecular, enfraquece as forças intermoleculares e diminui a resistência ao fluxo, levando à redução da viscosidade (Ramírez-Verduzco *et al.*, 2012; Mishra, Bukkarapu; Krishnasamy 2021). Esse comportamento dependente da temperatura é particularmente importante em aplicações como motores e sistemas hidráulicos, onde o desempenho do lubrificante depende da manutenção da viscosidade adequada em uma faixa de temperatura (McCabe, Cui; Cummings 2001; Markandan *et al.*, 2024).

A 40 °C, o biolubrificante sintetizado a partir de AGLs de óleo de canola apresentou uma viscosidade cinemática de 13,165 mm²·s⁻¹, situando-se dentro da faixa especificada para óleos básicos refinados RR-10 (8 a 14 mm²·s⁻¹), de acordo com a Resolução nº 911, de 18 de novembro de 2022, da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Essa conformidade ressalta o potencial deste produto para uso como óleo base biolubrificante.

Em relação ao índice de viscosidade (IV), os biolubrificantes sintetizados a partir de AGLs de óleo de algodão e canola apresentaram valores de 131,409 e 127,217, respectivamente. De acordo com o Instituto Americano de Petróleo (API), óleos com $IV \geq 120$ são classificados como óleos de alto índice de viscosidade e se enquadram no Grupo III (óleos base parafínicos altamente refinados). Esses óleos são recomendados para aplicações que exigem estabilidade térmica, como fluidos de transmissão automática, sistemas hidráulicos e lubrificantes de grau alimentício (Salimon *et al.*, 2010). Um alto índice de viscosidade contribui para a estabilidade do filme lubrificante, reduzindo o atrito e o desgaste entre superfícies metálicas, minimizando a necessidade de aditivos que melhoram a viscosidade (Alves *et al.*, 2013; Mishra, Bukkarapu; Krishnasamy 2021).

A estabilidade oxidativa do biolubrificante derivado de ácidos graxos livres (AGL) do óleo de algodão foi de aproximadamente 0,55 h. Esse valor relativamente baixo pode ser atribuído à sua maior concentração de ácido linoleico, quase 2,5 vezes maior que a do óleo de canola – cerca de 50% e 19%, respectivamente (ver Tabela 4.2). O impacto da composição lipídica na estabilidade oxidativa está bem estabelecido e deve ser considerado na seleção de matérias-primas para formulações estáveis (Erhan, Sharma; Perez 2006).

Vale ressaltar que, embora o consumo total de AGL não tenha sido alcançado, os biolubrificantes resultantes apresentaram baixos índices de acidez (abaixo de 1 mg NaOH/g), mesmo sem qualquer purificação adicional após o tratamento, além da remoção da água produzida e dos álcoois não reagidos, apresentando, portanto, baixo potencial corrosivo. Em um relatório semelhante, a esterificação dos AGLs de óleo de rícino com 2-etil-1-hexanol foi catalisada pela Transformada Eversa 2.0 e, após a otimização das condições de reação, os ésteres alquílicos resultantes foram caracterizados quanto as diversas propriedades físico-químicas. Por exemplo, os ésteres alquílicos apresentaram baixo índice de acidez (0,78 mg NaOH/g). Vale ressaltar que, conforme relatado pelos autores, os ésteres alquílicos apresentaram propriedades adequadas para serem empregados na formulação de biolubrificantes de alto desempenho (Monteiro *et al.*, 2024).

Os ésteres alquílicos sintetizados neste estudo apresentam índices de viscosidade cinemática (IVs) comparáveis ou até superiores aos relatados na literatura para ésteres monofuncionais derivados de óleo fúsel. Esses valores também são consistentes com as propriedades físico-químicas de lubrificantes comerciais à base de monoésteres.

Por exemplo, Dörmó *et al.* (2004) obteve conversão quase completa (~99,8%) de óleo fúsel por meio de esterificação enzimática, obtendo ésteres com altos índices de viscosidade, variando de 175 a 189, o que indica excelente formação de filme lubrificante e estabilidade térmica. Da mesma forma, Cerón *et al.* (2018) utilizou óleo fúsel simulado (composto de álcoois isoamílico, butílico e etílico) para sintetizar ésteres a partir de óleo de palmiste usando catálise enzimática. Os ésteres resultantes exibiram viscosidades cinemáticas entre 3 e 6 mm²/s a 40 °C, um índice de viscosidade intrínseca (IV) de 149,2 ± 2,1 e uma estabilidade oxidativa de aproximadamente 24 minutos. Em outro estudo semelhante, a esterificação de ácido esteárico com óleo fúsel foi catalisada por uma lipase imobilizada, resultando em ésteres alquílicos com desempenho semelhante – viscosidade cinemática de 9,12 mm²·s⁻¹ (Lima *et al.*, 2021).

Portanto, os ésteres alquílicos de óleo de canola produzidos no presente estudo apresentam viscosidades cinemáticas dentro da faixa para óleos básicos refinados RR-10 a 40 °C e índices de viscosidade entre 145 e 165, alinhando ou superando estudos previamente relatados para produtos semelhantes.

Além disso, os valores observados neste estudo são comparáveis aos de lubrificantes de éster monoalquílico comercialmente disponíveis, como Lexolube HS C, Lubricit 10L e Lexolube T 110 (Zs Lubes, 2025) que, embora não sintetizados enzimaticamente, tipicamente apresentam índices de viscosidade (IVs) variando de 120 a 160 e perfis de viscosidade semelhantes. Os ésteres derivados de óleo fúsel obtidos aqui não apenas reproduzem o comportamento físico-químico de monoésteres enzimáticos relatados anteriormente, como também correspondem ao desempenho funcional de lubrificantes comerciais estabelecidos. Esses resultados destacam seu potencial para aplicação em sistemas de lubrificação sustentáveis e ecologicamente corretos.

4.4 Conclusão

O uso do biocatalisador magnético Lig-Mag_CALB para a síntese de ésteres de óleo fúsel e AGLs de óleos de canola e algodão representa uma estratégia promissora e ambientalmente sustentável para a produção de biolubrificantes. O biocatalisador demonstrou alto desempenho catalítico, mantendo 85% de sua atividade inicial após 27 dias de armazenamento a 4°C, indicando excelente estabilidade e adequação para uso repetido em processos catalíticos.

A reutilização foi alcançada com perdas moderadas de atividade ao longo dos ciclos sucessivos. Além disso, os biolubrificantes produzidos apresentaram propriedades físico-químicas de acordo com as normas técnicas. Notavelmente, o biolubrificante sintetizado a partir do óleo de canola apresentou viscosidade cinemática de 13,165 mm²·s⁻¹ a 40 °C, dentro das especificações para óleos básicos rerrefinados do tipo RR-10, conforme estabelecido pela Resolução ANP nº 911/2022.

Ambos os produtos apresentaram índices de viscosidade acima de 120, qualificando-os como óleos básicos do Grupo III da API, adequados para formulações de lubrificantes de alto desempenho.

Esses achados reforçam o potencial do biocatalisador Lig-Mag_CALB como uma plataforma eficiente, reutilizável e economicamente viável para a produção de biolubrificantes adequados para aplicações como fluidos de transmissão automática, lubrificantes de grau alimentício e outras formulações que exigem alta estabilidade térmica e oxidativa.

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÃO

Os biocatalisadores utilizados na hidrólise enzimática, Lig-Mag_RML_0.5 e Lig-Mag_RML_5, apresentaram os maiores percentuais de hidrólise, especialmente quando aplicados aos óleos de algodão e de canola. Quando comparada à hidrólise química, a hidrólise enzimática com a enzima na forma livre alcançou valores próximos de 100% de hidrólise para todos os óleos avaliados na razão 1:3 (óleo/água), resultando na formação de produtos de ácidos graxos e possíveis intermediários como monoacilgliceróis (MAGs) e diacilgliceróis (DAGs), podendo ser uma alternativa para produção de emulsificantes. Já na razão 1:1, foi observada a hidrólise completa dos triglicerídeos.

A hidrólise enzimática utilizando biocatalisadores imobilizados demonstrou ser uma alternativa interessante, destacando-se pelo caráter sustentável do processo e pela possibilidade de recuperação e reutilização do biocatalisador. No entanto, são necessários estudos complementares, especialmente com os óleos de algodão e de canola, que apresentaram os melhores desempenhos. Esses resultados evidenciam o potencial do biocatalisador à base de lignina associada à magnetita como uma opção sustentável para a produção de ácidos graxos de alto valor agregado, com destaque para a síntese de biolubrificantes.

Os ácidos formados na hidrólise enzimática, em comparação com aqueles obtidos na hidrólise química, apresentaram os mesmos componentes majoritários, com valores próximos entre si. No entanto, a hidrólise enzimática possibilitou a formação de outros ácidos adicionais com os óleos de algodão, girassol, canola e soja, demonstrando maior seletividade.

O biocatalisador Lig-Mag_CALB, aplicado nas reações de esterificação com ácidos graxos livres provenientes dos óleos de canola e algodão, apresentou conversões superiores a 70% na formação de ésteres, com uma produtividade de 2,5 vezes maior do que a enzima na forma livre. O estudo cinético das condições operacionais identificou que a temperatura de 40 °C é a condição ideal para a produção dos ésteres de óleo fúsel.

A análise das propriedades físico-químicas dos ésteres obtidos utilizando os AGLs do óleo de canola apresentou viscosidade cinemática de 13,165 mm²·s⁻¹, estando dentro das especificações exigidas para óleos básicos refinados do tipo RR-10, conforme

a Resolução ANP nº 911/2022. Com base no parâmetro índice de viscosidade os ésteres formados com os ácidos do óleo de algodão e canola, ambos apresentaram índices de viscosidade superiores a 120, o que os qualifica como óleos básicos do Grupo III da API (*American Petroleum Institute*), tornando-os adequados para formulações de lubrificantes de alto desempenho.

No estudo de atividade catalítica do Lig-Mag_CALB, houve uma retenção de 85% da atividade ao longo dos 27 dias. Na estabilidade operacional, tanto com os ácidos do óleo de algodão quanto com os de canola, a conversão próxima de 60% mantida ao longo dos cinco ciclos de reuso do biocatalisador, não apresentando diferenças estatísticas entre as médias analisadas.

O estudo da hidrólise enzimática e da produção dos ésteres contribui diretamente para o cumprimento dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), uma vez que promove o aproveitamento de resíduos que, de outra forma, poderiam não ter destinação adequada. Além disso, essas abordagens podem reduzir a dependência de combustíveis fósseis e, conseqüentemente, minimizar os impactos ambientais associados ao seu uso.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, Bashar Mudhaffar; ZUBAIRI, Saiful Irwan; HURI, Hasniza Zaman; HAIRUNISA, Nany; YOUSIF, Emad; BASU, Roma Choudhury. Polyesters Based on Linoleic Acid for Biolubricant Basestocks: low-temperature, tribological and rheological properties. **Plos One**, v. 11, n. 3, p. 0151603, 23 mar. 2016.
- ABDULMALEK, Saadia A.; YAN, Yunjun. Recent developments of lipase immobilization technology and application of immobilized lipase mixtures for biodiesel production. **Biofuels, Bioproducts And Biorefining**, v. 16, n. 4, p. 1062-1094, 5 abr. 2022.
- ABU-DIEF, Ahmed M.; ABDEL-FATAH, Shima Mahdy. Development and functionalization of magnetic nanoparticles as powerful and green catalysts for organic synthesis. **Beni-Suef University Journal Of Basic And Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 55-67, mar. 2018.
- Adams, R. P.; Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy, 4.1th Edition, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2017.
- AOCS – American Oil Chemists' society (1998). **Official methods and recommended practices** (4a ed.). Champaign, 1998.
- ALBAITI; LILIASARI; SUMARNA, Omay; MARTOPRAWIRO, Muhamad Abdulkadir. A Study of Oil Viscosity Mental Model. **Journal Of Physics: Conference Series**, v. 812, p. 012030, fev. 2017.
- ALMEIDA, Cinthia Silva; SIMÃO NETO, Francisco; SOUSA, Patrick da Silva; AIRES, Francisco Izaias da Silva; MATOS FILHO, José Roberto de; CAVALCANTE, Antônio Luthierre Gama; SOUSA JUNIOR, Paulo Gonçalves de; MELO, Rafael Leandro Fernandes; SANTOS, José C. S. dos. Enhancing Lipase Immobilization via Physical Adsorption: advancements in stability, reusability, and industrial applications for sustainable biotechnological processes. **Acs Omega**, v. 9, n. 47, p. 46698-46732, 14 nov. 2024.
- ALVES, S.M.; BARROS, B.s.; TRAJANO, M.F.; RIBEIRO, K.s.B.; MOURA, E.. Tribological behavior of vegetable oil-based lubricants with nanoparticles of oxides in boundary lubrication conditions. **Tribology International**, v. 65, p. 28-36, set. 2013.
- API, Sistema de Licenciamento e Certificação de Óleo de Motor (Anexo E), American Petroleum Institute, Washington (2022). Disponível: https://www.api.org/-/media/files/certification/engine-oil-diesel/publications/1509_e21-%20portuguese.pdf. Acessado em 14 de abril de 2025.
- APPIAH, Godfred; TULASHIE, Samuel Kofi; AKPARI, Ephraim Edem Amoah; RENE, Eldon R.; DODOO, Daniel. Biolubricant production via esterification and transesterification processes: current updates and perspectives. **International Journal Of Energy Research**, v. 46, n. 4, p. 3860-3890, 11 dez. 2021.
- ASSIS, Sandra Aparecida de; OLIVEIRA, Rodrigo Queiroz; SOARES, Wagner Rodrigues de Assis; OLIVEIRA, Olga Maria Mascarenhas de Faria. Estabilização de enzimas: uma abordagem. **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 10, n. 2, p. 195-200, 31 dez. 2010.

ATTIA, N.K.; EL-MEKKAWI, S.A.; ELARDY, O.A.; ABDELKADER, E.A.. Chemical and rheological assessment of produced biolubricants from different vegetable oils. **Fuel**, v. 271, p. 117578, jul. 2020.

AVELAR, Matheus H.M.; CASSIMIRO, Débora M.J.; SANTOS, Kádima C.; DOMINGUES, Rui C.C.; CASTRO, Heizir F. de; MENDES, Adriano A.. Hydrolysis of vegetable oils catalyzed by lipase extract powder from dormant castor bean seeds. **Industrial Crops And Products**, v. 44, p. 452-458, jan. 2013.

BALTIERRA-TREJO, Eduardo; MÁRQUEZ-BENAVIDES, Liliana; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, Juan Manuel. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity: the case of laccase. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 119, p. 126-131, dez. 2015.

BANERJEE, Aditi; SINGH, Veena; SOLANKI, Kusum; MUKHERJEE, Joyeeta; GUPTA, Munishwar Nath. Combi-protein coated microcrystals of lipases for production of biodiesel from oil from spent coffee grounds. **Sustainable Chemical Processes**, v. 1, n. 1, p. 1-9, 8 ago. 2013.

BANIK, Sindrila Dutta; NORDBLAD, Mathias; WOODLEY, John M.; PETERS, Günther H.. A Correlation between the Activity of *Candida antarctica* Lipase B and Differences in Binding Free Energies of Organic Solvent and Substrate. **Acs Catalysis**, v. 6, n. 10, p. 6350-6361, 26 ago. 2016.

BARBERA, Elena; HIRAYAMA, Kyoko; MAGLINAO, Randy L.; DAVIS, Ryan W.; KUMAR, Sandeep. Recent developments in synthesizing biolubricants — a review. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 14, n. 3, p. 2867-2887, 10 fev. 2022.

BARBOSA, Milson S.; FREIRE, Cintia C.C.; BRANDÃO, Luma M.s.; PEREIRA, Ernandes B.; MENDES, Adriano A.; PEREIRA, Matheus M.; LIMA, Álvaro S.; SOARES, Cleide M.F. Biolubricant production under zero-waste *Moringa oleifera* Lam biorefinery approach for boosting circular economy. **Industrial Crops And Products**, v. 167, p. 113542, set. 2021.

BARBOSA, O. *et al.* Advantages of using hydrophobic supports for the immobilization of lipases: improved performance, selectivity and stability. **Biotechnol.** v. 33, n. 5, p.435–456, 2015.

BARROS, D. T.; COELHO, A.V; LACHTER, E. R.; GIL, R. A. S.; DAHMOUCHE, K.; SILVA, M. I. P.; SOUZA, A. L. F. **Esterification of lauric acid with butanol over mesoporous materials.** *Renewable Energy* v. 50, p. 585-589, 2012.

BART, J. C. J.; PALMERI, N.; CAVALLARO, S.; *Biodiesel Science and Technology: From Soil to Oil.* Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 1a Ed., CRC Press LLC, 2010.

BARTLETT, Gail J.; PORTER, Craig T.; BORKAKOTI, Neera; THORNTON, Janet M.. Analysis of Catalytic Residues in Enzyme Active Sites. **Journal Of Molecular Biology**, v. 324, n. 1, p. 105-121, nov. 2002.

BIYOUK, Zahra; SAYFZADEH, Saeed; ZAKERIN, Hamidreza; RAD, Amir Hossein Shirani; MASOULEH, Esmaeil Hadidi. Change in sowing date combined with water stress affects canola seed oil and fatty acid composition. **Nexo Revista Científica**, v. 33, n. 02, p. 368-377, 31 dez. 2020.

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

BOLIVAR, Juan M.; WOODLEY, John M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Is enzyme immobilization a mature discipline? Some critical considerations to capitalize on the benefits of immobilization. **Chemical Society Reviews**, v. 51, n. 15, p. 6251-6290, 2022.

BÔAS, Renata N. Vilas; LIMA, Rosemar de; MENDES, Adriano A.; FREITAS, Larissa; BENTO, Heitor B.s.; CARVALHO, Ana Karine F. de; CASTRO, Heizir F. de. Batch and continuous production of biolubricant from fusel oil and oleic acid: lipase screening, reactor system development, and reaction optimization. **Chemical Engineering And Processing - Process Intensification**, v. 168, p. 108568, nov. 2021.

BÔAS, Renata de N. Vilas. **Óleo fúsel como precursor na síntese de ésteres com propriedades aromáticas, emulsificantes e lubrificantes por biotransformação utilizando lipases imobilizadas**. 2018. 221 f. Tese (Doutorado) – Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada, Universidade Federal de São Paulo, Lorena – SP, 2018.

BORGDORF, R.; WARWEL, S.. Substrate selectivity of various lipases in the esterification of cis - and trans -9-octadecenoic acid. **Applied Microbiology And Biotechnology**, v. 51, n. 4, p. 480-485, 23 abr. 1999.

BRASIL. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – ANP. Resolução ANP nº 804/2019. Dispõe sobre os critérios para obtenção do registro de graxas e óleos lubrificantes e as responsabilidades e obrigações dos detentores de registro, produtores e importadores. **Diário Oficial da União**, p. 956-958, 2019. Disponível em: <https://atosoficiais.com.br/anp/resolucao-n-804-2019-dispoe-sobre-os-criterios-paraobtencao-do-registro-de-graxas-e-oleos-lubrificantes-e-as-responsabilidades-e-obrigacoes-dos-detentores-de-registro-produtores-e-importadores?origin=instituicao&q=804/2019>. Acesso em: 19 de fev. 2025.

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

CALERO, Juan; VERDUGO, Cristóbal; LUNA, Diego; SANCHO, Enrique D.; LUNA, Carlos; POSADILLO, Alejandro; BAUTISTA, Felipa M.; ROMERO, Antonio A.. Selective ethanolysis of sunflower oil with Lipozyme RM IM, an immobilized *Rhizomucor miehei* lipase, to obtain a biodiesel-like biofuel, which avoids glycerol production through the monoglyceride formation. **New Biotechnology**, v. 31, n. 6, p. 596-601, dez. 2014.

CARVALHO, Wagner C. A.; FREITAS, Rayane A. S.; BARBOSA, Milson S.; PAULA, Ariela V.; PEREIRA, Ernandes B.; MENDES, Adriano A.; FRANCESCHI, Elton; SOARES, Cleide M. F.. Preparation and characterization of new silica-based

heterofunctional biocatalysts utilizing low-cost lipase Eversa® Transform 2.0 and evaluation of their catalytic performance in isoamyl esters production from *Moringa oleifera* Lam oil. **Aims Bioengineering**, v. 11, n. 2, p. 185-211, 2024.

CASTIGLIONI, V. B. R.; BALLA, A.; CASTRO, C. de; SILVEIRA, J. M. **Fases de desenvolvimento da planta de girassol**. Londrina: EMBRAPA-CNPSO, 1997. 24p. (EMBRAPA CNPSO. Documento 59.)

CAVALCANTE, Glene Henrique Rodrigues et al. **Estudo de óleos nativos da amazônia (babaçu e andiroba): modificação química, caracterização e avaliação como biolubrificante**. 2016. 84 f. Tese (Doutorado) – Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Bionorte, Universidade Federal do Maranhão, São Luiz – MA, 2016.

CECILIA, Juan Antonio; PLATA, Daniel Ballesteros; SABOYA, Rosana Maria Alves; LUNA, Francisco Murilo Tavares de; CAVALCANTE, Celio L.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, Enrique. An Overview of the Biolubricant Production Process: challenges and future perspectives. **Processes**, v. 8, n. 3, p. 257, 25 fev. 2020.

CERÓN, Annie A.; BOAS, Renata N. Vilas; BIAGGIO, Francisco C.; CASTRO, Heizir F. de. Synthesis of biolubricant by transesterification of palm kernel oil with simulated fusel oil: batch and continuous processes. **Biomass And Bioenergy**, v. 119, p. 166-172, dez. 2018.

CHANDLER, Ian C.; QUINLAN, Paul T.; MCNEILL, Gerald P.. Lipase-catalyzed synthesis of chiral triglycerides. **Journal Of The American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 11, p. 1513-1518, nov. 1998.

CHENG, Ningning; ZHANG, Jingjing; YIN, Jingmei; LI, Shenmin. Computational and experimental research on mechanism of cis/trans isomerization of oleic acid. **Heliyon**, v. 4, n. 9, p. 68-169, set. 2018.

CHOWDHURY, Avisha; MITRA, Debarati; BISWAS, Dipa. Biolubricant synthesis from waste cooking oil via enzymatic hydrolysis followed by chemical esterification. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 88, n. 1, p. 139-144, 14 set. 2012.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra de Grãos, Brasília, DF, safra 2024/25, n. 6º levantamento, junho 2025.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 11, safra 2024/2025, n. 5º levantamento, fevereiro 2025.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira de Grãos, Brasília, DF, v. 4, safra 2023/2024, n. 2º levantamento, novembro 2023.

COSTANTINI, Aniello; CALIFANO, Valeria. Lipase Immobilization in Mesoporous Silica Nanoparticles for Biofuel Production. **Catalysts**, v. 11, n. 5, p. 629, 13 maio 2021.

CROOKS, Gavin E.; REES, Gareth D.; ROBINSON, Brian H.; SVENSSON, Martin; STEPHENSON, G. Richard. Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil

microemulsions: i. effect of ph and water content on reaction kinetics. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 48, n. 1, p. 78-88, 5 out. 1995.

DIAS, Arthur Luiz Baião; UBEYITOGULLARI, Ali; HATAMI, Tahmasb; MARTÍNEZ, Julian; CIFTCI, Ozan N.. Continuous production of isoamyl acetate from fusel oil under supercritical CO₂: a mass transfer approach. **Chemical Engineering Research And Design**, v. 176, p. 23-33, dez. 2021.

DOĞAN, Battal; ÖZER, Salih; EROL, Derviş. Exergy, exergoeconomic, and exergoenvironmental evaluations of the use of diesel/fusel oil blends in compression ignition engines. **Sustainable Energy Technologies And Assessments**, v. 53, p. 102475, out. 2022.

DÖRMÖ, N.; BÉLAFI-BAKÓ, K.; BARTHA, L.; EHRENSTEIN, U.; GUBICZA, L.. Manufacture of an environmental-safe biolubricant from fusel oil by enzymatic esterification in solvent-free system. **Biochemical Engineering Journal**, v. 21, n. 3, p. 229-234, nov. 2004.

DOMINGUES, Otávio; REMONATTO, Daniela; SANTOS, Letícia Karen dos; GALÁN, Julián Paul Martínez; FLUMIGNAN, Danilo Luiz; PAULA, Ariela Veloso de. Evaluation of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Magnetic Nanoparticles in Enzymatic/Chemical Hydroesterification for Biodiesel Production. **Applied Biochemistry And Biotechnology**, v. 194, n. 11, p. 5419-5442, 5 jul. 2022.

DOOL, H. van Den; KRATZ, P. Dec.. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal Of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

ENCIMAR, J. M.; NOGALES, S.; GONZÁLEZ, J. F. Biodiesel and biolubricant production from different vegetable oils through transesterification. **Engineering Reports**, v. 2, p. 1042-1052. 29 April 2020.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. **História da Soja. 2024**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>. Acesso em: 19 de fev. 2025.

ERHAN, S. Z., SHARMA, B. K. & PEREZ, J. M. Oxidation and low temperature stability of vegetable oil-based lubricants. **Industrial Crops and Products**, v. 24, n. 3, p. 292–299, 2006.

ESTEVEZ, Rafael; LÓPEZ-TENLLADO, Francisco J.; AGUADO-DEBLAS, Laura; BAUTISTA, Felipa M.; ROMERO, Antonio A.; LUNA, Diego. Evaluation of Advanced Biofuels in Internal Combustion Engines: diesel/fusel oil/vegetable oil triple blends. **Fuels**, v. 5, n. 4, p. 660-672, 18 out. 2024.

FARIA, Priscila Esteves de; NUNES, Gabriel Stamato; BREDÁ, Gabriela Coelho; AGUIEIRAS, Erika Cristina Gonçalves; MOTA, Maria Beatriz Santos; DOBLER, Leticia; FREIRE, Denise Maria Guimarães; ALMEIDA, Rodrigo Volcan; MESQUITA, Rafael Dias. Unveiling six novel CALB-like lipases using genome-centric and patent-driven prospecting. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 181, p. 110525, dez. 2024.

FÉ, Luana X.s.G.M.; SANTOS, Michelle M. dos; COSTA, Carolina S.; PINTO, Martina C.C.; OLIVEIRA, Renata A. de; CIPOLATTI, Eliane P.; PINTO, José Carlos;

LANGONE, Marta A.P.; DELLAMORA-ORTIZ, Gisela M.; MANOEL, Evelin A.. Lipase from *Rhizomucor miehei* onto home-made hydrophobic polymers: stable and efficient biocatalysts. **Process Biochemistry**, v. 142, p. 136-148, jul. 2024.

FERNANDEZ-LOPEZ, Laura; PEDRERO, Sara G.; LOPEZ-CARROBLES, Nerea; GORINES, Beatriz C.; VIRGEN-ORTÍZ, Jose J.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Effect of protein load on stability of immobilized enzymes. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 98, p. 18-25, mar. 2017.

FILIFE, Hugo A. L.; ALMEIDA, Maëva C. F.; TEIXEIRA, Rafaela R.; ESTEVES, Margarida I. M.; HENRIQUES, César A.; ANTUNES, Filipe E.. Dancing with oils – the interaction of lipases with different oil/water interfaces. **Soft Matter**, v. 17, n. 30, p. 7086-7098, 2021.

FILON, Dimosthenis; ANASTOPOULOS, George; KARONIS, Dimitrios. Synthesis and Evaluation of Sunflower-Oil-Based Esters as Biolubricant Base Oils Using Ca/TEA Alkoxide Catalyst. **Lubricants**, v. 13, n. 8, p. 345, 2 ago. 2025.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Tamanho do mercado de lubrificantes automotivos, participação e análise da indústria, por tipo de óleo (sintético, semissintético e convencional), por tipo de produto (óleo de motor, óleo de engrenagem, fluidos de transmissão, refrigerante e fluido de freio e graxas) e previsão regional, 2024-2032**. Fevereiro de 2024. Disponível em: <https://www.fortunebusinessinsights.com/pt/automotive-lubricants-market-102681>. Acesso em: 20 de fev. 2025.

FORTUNE BUSINESS INSIGHTS. **Tamanho do mercado de biolubrificantes, participação e análise da indústria, por aplicação (fluidos hidráulicos, fluidos metalúrgicos, óleos de motosserra, agentes de liberação de moldes, óleos de motor de dois ciclos, óleos de engrenagens, graxas e outros), por indústria de uso final (automotivo e outros transportes), Metalurgia, Mineração, Silvicultura, Marinha, Motores e Outros) e Previsão Regional, 2024-2032**. Fevereiro de 2023. Disponível em: <https://www.fortunebusinessinsights.com/pt/bio-lubricants-market-104654>. Acessado em: 20 de fev. 2025.

GIRÃO NETO, Carlos Alberto Chaves; PRASILDE, Isabel Cristina Medeiros; SILVA, Amanda Santos da; SILVA, Lorena Mara Alexandre e; CANUTO, Kirley Marques; FONTENELLE, Raquel Oliveira dos Santos; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Enzymatic synthesis of citronellyl butyrate by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on magnetic cashew apple bagasse lignin. **Process Biochemistry**, v. 131, p. 244-255, ago. 2023.

GHASEMI, Saba; YOUSEFI, Maryam; NIKSERESHT, Ahmad; OMIDI, Hoda. Covalent binding and in-situ immobilization of lipases on a flexible nanoporous material. **Process Biochemistry**, v. 102, p. 92-101, mar. 2021.

GHIDE, Michael Kidane; LI, Kai; WANG, Jianhua; ABDULMALEK, Saadiah A.; YAN, Yunjun. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase on magnetic multiwalled carbon nanotubes towards the synthesis of structured lipids rich in sn-2 palmitic acid and sn-1,3 oleic acid (OPO) for infant formula use. **Food Chemistry**, v. 390, p. 133171, out. 2022.

GLOBAL RISK COMMUNITY. *Bio Lubricant Market is Projected to Grow at a CAGR of 3.45% by 2030*. Global Risk Community, 2021. Disponível em: <https://globalriskcommunity.com/profiles/blogs/bio-lubricant-market-is-projected-to-grow-at-a-cagr-of-3-45-by-30> . Acesso em: 27 jul. 2025.

GUERRA, A. P.; RASPE, D. T.; ROSA, A. C. s.; SILVA, C. Síntese de ácidos graxos livres do óleo de caroço de algodão. **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 136-148, 15 nov. 2022.

GUIMARÃES, José Renato; MIRANDA, Letícia Passos; BENTO, Renato Franco de Camargo; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; TARDIOLI, Paulo Waldir. A hydroesterification reaction system to produce octyl esters using degummed soybean oil as substrate: combining reusable free and immobilized lipases. **Fuel**, v. 368, p. 131609, jul. 2024.

GUL, M.; ZULKIFLI, N.W.M.; MASJUKI, H.H.; KALAM, M.A.; MUJTABA, M.A.; HARITH, M.H.; SYAHIR, A.Z.; AHMED, Waqar; FAROOQ, Abdul Bari. Effect of TMP-based-cottonseed oil-biolubricant blends on tribological behavior of cylinder liner-piston ring combinations. **Fuel**, v. 278, p. 118242, out. 2020.

GUO, Hui; LEI, Bingshuang; YU, Jianwei; CHEN, Yunfei; QIAN, Junqing. Immobilization of lipase by dialdehyde cellulose crosslinked magnetic nanoparticles. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 287-296, ago. 2021.

HÁJEK, Martin; VÁVRA, Aleš; CARMONA, Héctor de Paz; KOCÍK, Jaroslav. The Catalysed Transformation of Vegetable Oils or Animal Fats to Biofuels and Bio-Lubricants: a review. **Catalysts**, v. 11, n. 9, p. 1118, 17 set. 2021.

HAMNAS, Amina; UNNIKRISHNAN, G.. Bio-lubricants from vegetable oils: characterization, modifications, applications and challenges ∴ review. **Renewable And Sustainable Energy Reviews**, v. 182, p. 113413, ago. 2023.

HASAN, Fariha; SHAH, Aamer Ali; HAMEED, Abdul. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, jun. 2006.

HONG, Seohyun; KIM, In-Hwan; KIM, Byung Hee. Lipase-catalyzed hydroesterification process for isopropyl palmitate synthesis from palm stearin. **Process Biochemistry**, v. 134, p. 44-53, nov. 2023.

JAFARI, Aliakbar; MAJDOUB, Mohammed; SENGOTTUVELU, Dineshkumar; UCAK-ASTARLIOGLU, Mine G.; AL-OSTAZ, Ahmed; NOURANIAN, Sasan. Tribological Properties of Synthetic and Biosourced Lubricants Enhanced by Graphene and Its Derivatives: a review. **Acs Omega**, v. 9, n. 52, p. 50868-50893, 16 dez. 2024.

KAUR, Tarandeep; SHARMA, Pawan K.; BRAR, A.s.; CHOUDHARY, Anil K.; SHARMA, Sanjula; BRAR, H.s.. Fiber quality, oil seed composition and fatty acid profiling of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seed as influenced by sub-surface drip-irrigation and foliar-fertilization strategy in semi-arid agro-ecology of south-Asia. **Journal Of Agriculture And Food Research**, v. 19, p. 101604, mar. 2025.

KOTOGÁN, Alexandra; FURKA, Zsófia Terézia; KOVÁCS, Tamás; VOLFORD, Bettina; PAPP, Dóra Anna; VARGA, Mónika; HUYNH, Thu; SZEKERES, András; PAPP, Tamás; VÁGVÖLGYI, Csaba. Hydrolysis of Edible Oils by Fungal Lipases: an

effective tool to produce bioactive extracts with antioxidant and antimicrobial potential. **Foods**, v. 11, n. 12, p. 1711, 10 jun. 2022.

KHAN, Shoyeb; DAS, Probir; QUADIR, Mohammed Abdul; THAHER, Mahmoud; ANNAMALAI, Senthil Nagappan; MAHATA, Chandan; HAWARI, Alaa H.; JABRI, Hareb Al. A comparative physicochemical property assessment and techno-economic analysis of biolubricants produced using chemical modification and additive-based routes. **Science Of The Total Environment**, v. 847, p. 157648, nov. 2022.

KHATTAB, Rabie; REMPEL, Curtis; SUH, Miyoung; THIYAM, Usha. Quality of Canola Oil Obtained by Conventional and Supercritical Fluid Extraction. **American Journal Of Analytical Chemistry**, v. 03, n. 12, p. 966-976, 2012.

KUNIK, Oleksandra; SARIBEKOVA, Diana; LAZZARA, Giuseppe; CAVALLARO, Giuseppe. Emulsions based on fatty acid from vegetable oils for cosmetics. **Industrial Crops And Products** v. 189, p. 115776, dez. 2022.

KURRE, Santosh Kumar; YADAV, Jitendra. A review on bio-based feedstock, synthesis, and chemical modification to enhance tribological properties of biolubricants. **Industrial Crops And Products**, v. 193, p. 116122, mar. 2023.

LEVY, Hildyson Moreira; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; ALBUQUERQUE, Tiago Lima de; SANT'ANA, Hosiberto Batista; FEITOSA, Filipe Xavier; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Biosynthesis of biolubricant catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on nanocomposite of cashew apple bagasse lignin. **Renewable Energy**, v. 243, p. 122452, abr. 2025.

LIMA, Paula; SILVA, Jouciane; MELO, Rafael; FRANCISCO NETO; FECHINE, Pierre; ROCHA, Maria; GONÇALVES, Luciana; SANTOS, José dos. DIMENSIONING VINYL SULFONIC SUPPORTS FROM CASHEW APPLE BAGASSE BIOMASS IN THE IMMOBILIZATION OF LIPASES. **Química Nova**, v. 47, n. 5, p. 1-11, 2024.

LIMA, Rosemar de; BENTO, Heitor B. S.; REIS, Cristiano E. R.; BÔAS, Renata N. Vilas; FREITAS, Larissa de; CARVALHO, Ana K. F.; CASTRO, Heizir F. de. Biolubricant Production from Stearic Acid and Residual Secondary Alcohols: system and reaction design for lipase-catalyzed batch and continuous processes. **Catalysis Letters**, v. 152, n. 2, p. 547-558, 19 maio 2021.

MAHFOUDHI, Amira; BENMABROUK, Sameh; FENDRI, Ahmed; SAYARI, Adel. Fungal lipases as biocatalysts: a promising platform in several industrial biotechnology applications. **Biotechnology And Bioengineering**, v. 119, n. 12, p. 3370-3392, 4 out. 2022.

MARINHO, Luis Henrique Nogueira; ARAGÃO, Franciely Velozo; CHIROLI, Daiane Maria de Genaro; ZOLA, Fernanda Cavicchioli; TEBCHERANI, Sergio Mazurek. A systematic review of fusel oil as a renewable biofuel: challenges, opportunities, and circular economy integration. **Fuel**, v. 402, p. 135924, dez. 2025.

MARKANDAN, Kalaimani; NAGARAJAN, Thachnatharen; PETER, Angela Paul; VIGNESAN, Praveen; ANANTHAN, Lenesh Sevan; SANKARAN, Revathy; KHALID, Mohammad. Recent progress in tribological and thermophysical behaviour of bio-based nanolubricant: a review. **Emergent Materials**, v. 8, n. 1, p. 113-140, 27 nov. 2024.

MATTOS, Fernanda R.; MIGUEL JÚNIOR, José; SABI, Guilherme J.; GARCIA, Pedro H. D.; CARVALHO, Patrícia O.; LUIZ, Jaine H. H.; MENDES, Adriano A.. Design of a New Chemoenzymatic Process for Producing Epoxidized Monoalkyl Esters from Used Soybean Cooking Oil and Fusel Oil. **Catalysts**, v. 13, n. 3, p. 543, 8 mar. 2023.

MATOS, Ricardo Alexandre Figueiredo de; GONÇALVES FILHO, Luizmar; BARBOSA, Ysadora Jordanna dos Santos. Síntese de biolubrificante a partir do óleo de mamona. **Studies In Engineering And Exact Sciences**, v. 6, n. 1, p. e13567, 21 jan. 2025.

MCNUTT, Josiah; HE, Quan (Sophia). Development of biolubricants from vegetable oils via chemical modification. **Journal Of Industrial And Engineering Chemistry**, v. 36, p. 1-12, abr. 2016.

MELLO, Bruna Tais Ferreira de; CARDOSO FILHO, Lúcio; SILVA, Camila da. PRODUÇÃO DE BIODIESEL A PARTIR DA REAÇÃO DE HIDROESTERIFICAÇÃO. **Uningá Review**, v. 35, p. 3522, 31 ago. 2020.

MENDOZA-PEDROZA, José de Jesús; SÁNCHEZ-RAMÍREZ, Eduardo; SEGOVIA-HERNÁNDEZ, Juan Gabriel; HERNÁNDEZ, Salvador; ORJUELA, Alvaro. Recovery of alcohol industry wastes: revaluation of fusel oil through intensified processes. **Chemical Engineering And Processing - Process Intensification**, v. 163, p. 108329, jun. 2021.

MENDES, Adriano A.; SOARES, Cleide M. F.; TARDIOLI, Paulo W.. Recent advances and future prospects for biolubricant base stocks production using lipases as environmentally friendly catalysts: a mini-review. **World Journal Of Microbiology And Biotechnology**, v. 39, n. 1, p. 02-18, 24 nov. 2022.

MCCABE, Clare; CUI, Shengting; CUMMINGS, Peter T.. Characterizing the viscosity–temperature dependence of lubricants by molecular simulation. **Fluid Phase Equilibria**, v. 183-184, p. 363-370, jul. 2001.

MISHRA, Shashank; BUKKARAPU, Kiran Raj; KRISHNASAMY, Anand. A composition based approach to predict density, viscosity and surface tension of biodiesel fuels. **Fuel**, v. 285, p. 119056, fev. 2021.

MHADMHAN, Sareena; YOOSUK, Boonyawan; HENPRASERTTAE, Suparoek. Selective lipase-catalyzed hydrolysis for removal of diglyceride in palm oil. **Separation And Purification Technology**, v. 349, p. 127897, dez. 2024.

MOHAMED, Abdi Moushab; GÜLTEN, Yalçın Zehra; MUSTAFA, Dağ. Experimental investigation of the production of biolubricant from waste frying oil. **Biomass Conversion And Biorefinery**, v. 13, n. 7, p. 6395-6407, 22 fev. 2023.

MONTEIRO, Rodolpho R.C.; NETA, Maria M.F. de Melo; SOARES, Jorge B.; LOMONACO, Diego; LUNA, F. Murilo T. de; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; VIEIRA, Rodrigo S.. Eversa transform 2.0 immobilized on a hydrophobic support enables the solvent-free almost quantitative esterification of the free fatty acids from soybean oil with neopentylglycol. **Renewable Energy**, v. 237, p. 121598, dez. 2024.

MONTIEL, María Claudia; GÓMEZ, María; MURCIA, María Dolores; ORTEGA-REQUENA, Salvadora; MÁXIMO, Fuensanta; BASTIDA, Josefa. Sustainable

Biocatalytic Synthesis of a Second-Generation Biolubricant. **Sustainability**, v. 16, n. 4, p. 1615, 15 fev. 2024.

MOREIRA, Katerine da S.; OLIVEIRA, André L. B. de; M. JÚNIOR, Lourembergue S. de; MONTEIRO, Rodolpho R. C.; ROCHA, Thays N. da; MENEZES, Fernando L.; FECHINE, Lillian M. U. D.; DENARDIN, Juliano C.; MICHEA, Sebastian; FREIRE, Rafael M.. Lipase From *Rhizomucor miehei* Immobilized on Magnetic Nanoparticles: performance in fatty acid ethyl ester (faee) optimized production by the taguchi method. **Frontiers In Bioengineering And Biotechnology**, v. 8, p. 1-17, 30 jun. 2020.

MOZHAEV, Vadim V.; BEREZIN, Iliya V.; MARTINEK, Karel; NOSOH, Yoshiaki. Structure-Stability Relationship in Proteins: fundamental tasks and strategy for the development of stabilized enzyme catalysts for biotechnolog. **Critical Reviews In Biochemistry**, v. 23, n. 3, p. 235-281, jan. 1988.

NÁJERA-MARTÍNEZ, Erik Francisco; MELCHOR-MARTÍNEZ, Elda M.; SOSA-HERNÁNDEZ, Juan Eduardo; LEVIN, Laura Noemí; PARRA-SALDÍVAR, Roberto; IQBAL, Hafiz M.N.. Lignocellulosic residues as supports for enzyme immobilization, and biocatalysts with potential applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 208, p. 748-759, maio 2022.

National Institute of Standards and Technology - NIST, NIST Chemistry WebBook, (2018). Disponível: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acessado em 15 de março de 2025.

NELSON, Matthew N. *et al.* Strategies to improve field establishment of canola: A review. **Advances in Agronomy**, v. 175, p. 133–177, 2022.

NITBANI, F.O., TJITDA, P.J.P., NUROHMAH, B.A., WOGO, H.E. Preparation of Fatty Acid and Monoglyceride from Vegetable Oil. **J Oleo Sci**, 69(4), p. 277-295, 2020.

NOGALES-DELGADO, Sergio; CABANILLAS, Agustina Guiberteau; ROMERO, Ángela García; MARTÍN, José María Encinar. Monitoring tert-Butylhydroquinone Content and Its Effect on a Biolubricant during Oxidation. **Molecules**, v. 27, n. 24, p. 8931, 15 dez. 2022.

NOGALES-DELGADO, Sergio; MARTÍN, José María Encinar; OCAÑA, Mercedes Sánchez. Use of mild reaction conditions to improve quality parameters and sustainability during biolubricant production. **Biomass And Bioenergy**, v. 161, p. 106456, jun. 2022.

NOR, Nurazira; SALIH, Nadia; SALIMON, Jumat. Chemically modified *Jatropha curcas* oil for biolubricant applications. **Hemijaska Industrija**, v. 75, n. 2, p. 117-128, 2021.

OJHA, Pawan Kumar; POUDEL, Darbin Kumar; ROKAYA, Anil; MAHARJAN, Salina; TIMSINA, Sunita; POUDEL, Ambika; SATYAL, Rakesh; SATYAL, Prabodh; SETZER, William N.. Chemical Compositions and Essential Fatty Acid Analysis of Selected Vegetable Oils and Fats. **Compounds**, v. 4, n. 1, p. 37-70, 17 jan. 2024.

OLIVEIRA, Airton A.; SANTOS, Rayan P.s.; ROCHA, Wesley S.; LUNA, Francisco M.T. de; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MONTEIRO, Rodolpho R.C.; VIEIRA, Rodrigo S.. Design of a biolubricant by the enzymatic esterification of the free fatty acids from castor oil with neopentylglycol. **Process Biochemistry**, v. 147, p. 318-331, dez. 2024.

OLIVEIRA, Camila Raquel Santos de. **Obtenção e caracterização de lubrificantes biodegradáveis pela epoxidação do óleo de canola (*Brassica napus*)**. 2024. 60 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité - Pb, 2024.

OLIVEIRA, Renato Santana de. **Conversão catalítica heterogênea de biodiesel de soja epoxidado via reação de acetoxilação: Síntese e caracterização de novos produtos com potencial aplicação como aditivos**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

OUATTARA, Anianhou Yaya; SORO, Doudjo; KAKOU, Ernest Kouassi; KONE, Kouwelton; ASSIDJO, Emmanuel; MABIA, Gerardin; KAMAGATE, Mahamadou. Synthesis and characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* immobilised cells from cashew apple bagasse. **Bioresources**, v. 18, n. 2, p. 3736-3749, 14 abr. 2023.

PACHECO, Bruna; ANDRADE, Grazielle; PAULA, Ariela de. LIPASE FROM *Rhizopus oryzae* IMMOBILIZED ON CORN COB POWDER: a new approach for dietetic triglyceride synthesis in a fixed bed reactor. **Química Nova**, v. 47, n. 7, p. 1-12, 2024.

PARENTE, E.J.; MARQUES, J.P.C.; RIOS, I.C.; CECILIA, J.A.; RODRÍGUEZ-CASTELLÓN, E.; LUNA, F.M.T.; CAVALCANTE, C.L.. Production of biolubricants from soybean oil: studies for an integrated process with the current biodiesel industry. **Chemical Engineering Research And Design**, v. 165, p. 456-466, jan. 2021.

PAREKH, Krunal; GAUR, Rama; SHAHABUDDIN, Syed. A facile approach for refining waste lubricant oil: A hazardous water contaminant. **Materials Today: Proceedings**, 2024. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2024.01.047>

PAWAR, Rajendra V.; HULWAN, Dattatray B.; MANDALE, Maruti B.. Recent advancements in synthesis, rheological characterization, and tribological performance of vegetable oil-based lubricants enhanced with nanoparticles for sustainable lubrication. **Journal Of Cleaner Production**, v. 378, p. 134454, dez. 2022.

PEDROSO, Jeslaine Schuarz. **Controle de qualidade de fórmulas manipuladas na cidade de guarapuava-pr contendo óleo de girassol**. 2020. 47 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro Universitário Guairacá, Guarapuava, 2020.

PÉREZ, Eduardo R.; CARDOSO, Daniel R.; FRANCO, Douglas W. Análise dos álcoois, ésteres e compostos carbonílicos em amostras de óleo fúsel. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 10-12, fev. 2001.

PERSSON, Mattias; MLADENOSKA, Irina; WEHTJE, Ernst; ADLERCREUTZ, Patrick. Preparation of lipases for use in organic solvents. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 31, n. 6, p. 833-841, nov. 2002.

PETRARU, Ancuța; URSACHI, Florin; AMARIEI, Sonia. Nutritional Characteristics Assessment of Sunflower Seeds, Oil and Cake. Perspective of Using Sunflower Oilcakes as a Functional Ingredient. **Plants**, v. 10, n. 11, p. 2487, 17 nov. 2021.

PINHEIRO, Carolina T.; QUINA, Margarida J.; GANDO-FERREIRA, Licínio M.. Management of waste lubricant oil in Europe: a circular economy approach. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology**, p. 1-36, 4 jun. 2020.

PLEISS, Jürgen; FISCHER, Markus; SCHMID, Rolf D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry And Physics Of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 67-80, jun. 1998.

QIN, Zehua; GUO, Wei; LIU, Jun; ZHAO, Guoqin; LIU, Mingxin; SONG, Xin. Reduced-Cost Production of Sophorolipids by *Starmerella bombicola* CGMCC1576 Grown on Cottonseed Molasses and Cottonseed Oil-Based Medium. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 24, n. 6, p. 5759, 17 mar. 2023.

QUINCHIA, L.A.; DELGADO, M.A.; FRANCO, J.M.; SPIKES, H.A.; GALLEGOS, C.. Low-temperature flow behaviour of vegetable oil-based lubricants. **Industrial Crops And Products**, v. 37, n. 1, p. 383-388, maio 2012.

RAFIEE, F.; REZAEI, M.. Different strategies for the lipase immobilization on the chitosan based supports and their applications. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 170-195, maio 2021.

RAMALHO, H.F.; SUAREZ, P. A. A Química dos óleos e gorduras e seus processos de extração e refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 1, p. 2-15, 2013.

RAMÍREZ-VERDUZCO, Luis Felipe; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, Javier Esteban; JARAMILLO-JACOB, Alicia del Rayo. Predicting cetane number, kinematic viscosity, density and higher heating value of biodiesel from its fatty acid methyl ester composition. **Fuel**, v. 91, n. 1, p. 102-111, jan. 2012.

RAMOS, Julia Daniela Ferreira. **Epoxidação metílica do óleo de algodão visando a obtenção de um lubrificante biodegradável**. 2024. 46 f. TCC (Graduação) - Curso de Licenciatura em Química, Centro de Educação e Saúde-Ces, Universidade Federal de Campina Grande-Ufcp, Cuité – Pb, 2024.

REEVES, Carlton J.; MENEZES, Pradeep L.; JEN, Tien-Chien; LOVELL, Michael R.. The influence of fatty acids on tribological and thermal properties of natural oils as sustainable biolubricants. **Tribology International**, v. 90, p. 123-134, out. 2015.

REEVES, C. J.; SIDDAIAH, A.; MENEZES, P. L. A review on the science and technology of natural and synthetic biolubricants. **Journal of Bio- and Tribo-Corrosion**, v. 3, n. 1, p. 11, 2017.

RIBEIRO, Bernardo Dias; CASTRO, Aline Machado de; COELHO, Maria Alice Zarur; FREIRE, Denise Maria Guimarães. Production and Use of Lipases in Bioenergy: a review from the feedstocks to biodiesel production. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-16, 7 jul. 2011.

RIBEIRO FILHO, Paulo Roberto Campos Flexa; SANTOS, Leonardo dos Santos e. The influence of unsaturation modifications on the tribological characteristics of bio-based lubricants obtained from vegetable oils: a review. **Journal Of The Brazilian Society Of Mechanical Sciences And Engineering**, v. 47, n. 5, p. 1-12, 4 abr. 2025.

RODRIGUES, Rafael C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto. Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 64, n. 1-2, p. 1-22, jun. 2010.

RODRIGUES, Rafael C.; AYUB, Marco A. Záchia. Effects of the combined use of *Thermomyces lanuginosus* and *Rhizomucor miehei* lipases for the transesterification and hydrolysis of soybean oil. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 682-688, mar. 2011.

- ROCHA, Maria Valderez Ponte; RODRIGUES, Tigressa Helena Soares; ALBUQUERQUE, Tiago Lima de; GONÇALVES, Luciana Rocha B.; MACEDO, Gorete Ribeiro de. Evaluation of dilute acid pretreatment on cashew apple bagasse for ethanol and xylitol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 243, p. 234-243, maio 2014.
- SABI, Guilherme J.; GAMA, Rafaela S.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; CANCINO-BERNARDI, Juliana; MENDES, Adriano A.. Decyl esters production from soybean-based oils catalyzed by lipase immobilized on differently functionalized rice husk silica and their characterization as potential biolubricants. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 157, p. 110019, jun. 2022.
- SAKA, Abiodun; ABOR, Tobeckukwu K.; OKAFOR, Anthony C.; OKORONKWO, Monday U.. Thermo-rheological and tribological properties of low- and high-oleic vegetable oils as sustainable bio-based lubricants. **Rsc Sustainability**, v. 3, n. 3, p. 1461-1476, 2025.
- SALGADO, Cleonice Aparecida; SANTOS, Clarissa Isabela Aparecida dos; VANETTI, Maria Cristina Dantas. Microbiais lipases: propitious biocatalysts for the food industry. **Food Bioscience**, v. 45, p. 101509, fev. 2022.
- SALIMON, J., SALIH, N. & YOUSIF, E. Biolubricants: Raw materials, chemical modifications and environmental benefits. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 5, p. 519–530, 2010.
- SALIH, N., SALIMON J. A Review on Eco-Friendly Green Biolubricants from Renewable and Sustainable Plant Oil Sources. **Biointerface Research In Applied Chemistry**, v. 11, n. 5, p. 13303-13327, 8 fev. 2021.
- SAMPAIO, C. S.; ANGELOTTI, J. A.F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; HIRATA, D. B. Lipase immobilization via cross-linked enzyme aggregates: problems and prospects ∴ a review. **International Journal Of Biological Macromolecules**, v. 215, p. 434-449, ago. 2022.
- SANTOS, Jamisdean Sales dos. **Avaliação tribológica de óleo vegetal de palma com nanopartículas de cobre e nanotubos de carbono**. 2024. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus – Am, 2024.
- SANTOS, Kádima C.; CASSIMIRO, Débora M.J.; AVELAR, Matheus H.M.; HIRATA, Daniela B.; CASTRO, Heizer F. de; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, Roberto; MENDES, Adriano A.. Characterization of the catalytic properties of lipases from plant seeds for the production of concentrated fatty acids from different vegetable oils. **Industrial Crops And Products**, v. 49, p. 462-470, ago. 2013.
- SANTOS, Leticia Karen dos; CALERA, Gabrielle Cyntia; STRINGACI, Jordana Camila Tagiarolli; VILAÇA, Sabrina Mara; VIVIANI, Vinicius Emmanuel; FLUMIGNAN, Danilo Luiz. Estado da arte da aplicação do processo de hidroesterificação na produção de biodiesel a partir de matérias-primas de baixa qualidade. **Revista Principia - Divulgação Científica e Tecnológica do Ifpb**, v. 1, n. 28, p. 178, 31 dez. 2015.
- SANTOS, Rayan P. S.; ARAUJO, Lucas L.; OLIVEIRA, Airton A.; SILVA, Thamyres F. da; ROCHA, Thales G.; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; MONTEIRO,

Rodolpho R. C.; VIEIRA, Rodrigo S.. Optimization of the Full Hydrolysis of Babassu Oil by Combi-Lipases. **Catalysts**, v. 15, n. 3, p. 209, 22 fev. 2025.

SERPA, Juliana de França; SILVA, Jouciane de Sousa; REIS, Carla Luzia Borges; MICOLI, Luca; SILVA, Lorena Mara Alexandre e; CANUTO, Kirley Marques; MACEDO, André Casimiro de; ROCHA, Maria Valderez Ponte. Extraction and characterization of lignins from cashew apple bagasse obtained by different treatments. **Biomass And Bioenergy**, v. 141, p. 105728, out. 2020.

SERPA, Juliana de França; MATIAS, Gabriel Ab; FECHINE, Pierre Ba; COSTA, Victor M da; FREIRE, Rafael M; DENARDIN, Juliano C; GONÇALVES, Luciana Rb; MACEDO, André C de; ROCHA, Maria Vp. New nanocomposite made of cashew apple bagasse lignin and Fe₃O₄ for immobilizing of lipase B from *Candida antarctica* aiming at esterification. **Journal Of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 96, n. 9, p. 2472-2487, 5 jun. 2021.

SILVA, Ana Paula Teixeira da. **Síntese de biolubrificantes por transesterificação de lipídeo microbiano com óleo fúsel empregando catalisador heterogêneo químico e bioquímico**. 2019. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Pós- Graduação em Engenharia Química, Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

SILVA, Fausto M. W. G.; SZEMES, József; MUSTASHEV, Akan; TAKÁCS, Orsolya; IMARAH, Ali O.; POPPE, László. Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica* on Magnetic Nanoparticles Enhances Its Selectivity in Kinetic Resolutions of Chiral Amines with Several Acylating Agents. **Life**, v. 13, n. 7, p. 1560, 14 jul. 2023.

SILVA, Fernando Alves da. **Desenvolvimento e caracterização de lubrificantes biodegradáveis a partir do óleo de milho**. 2024. 67 f. TCC (Graduação) - Curso de Bacharelado em Farmácia, Centro de Educação e Saúde, Universidade Federal de Campina Grande, Cuité – Pb, 2024.

SILVA, Luiz Cláudio Costa; MATTÁ, Loreta Buuda da; PEREIRA, Guilherme Ramos; BUENO, Rafael Delmond; PIOVESAN, Newton Deniz; CARDINAL, Andrea J.; GOD, Pedro Ivo Vieira Good; RIBEIRO, Cleberson; DAL-BIANCO, Maximiller. Association studies and QTL mapping for soybean oil content and composition. **Euphytica**, v. 217, n. 2, p. 1-20, 20 jan. 2021.

SILVA, Hellyda Katharine Tomaz de Andrade. **Estudo da influência do biodiesel de mamona como aditivo antioxidante para o biodiesel de girassol e soja**. 2011.182 f. Dissertação (Mestrado) -Química, Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal-RN, 2011.

SILVA, J.s.; MENDES, J.s.; CORREIA, J.A.C.; ROCHA, M.V.P.; MICOLI, L.. Cashew apple bagasse as new feedstock for the hydrogen production using dark fermentation process. **Journal Of Biotechnology**, v. 286, p. 71-78, nov. 2018.

SILVA, Rafaela Maciel Moreno da; PINTO, Camila Prestes. **Avaliação da viabilidade técnica da utilização de hidrocarbonetos produzidos a partir do hidrotreatamento de óleo de microalga como constituintes de um óleo básico lubrificante**. 2024. 85 f. TCC (Graduação) – Curso de Engenharia Química, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, 2024.

SIMÃO NETO, Francisco; SOUSA, Patrick da Silva; MELO, Rafael Leandro Fernandes; CAVALCANTE, Antônio Luthierre Gama; SOUSA JUNIOR, Paulo

Gonçalves de; MARCIANO, Sara Jessica; LOMONACO, Diego; VALENÇA, Ranieri Dantas; CARMO, Frederico Ribeiro do; MATTOS, Marcos Carlos de. Enzymatic Conversion of Mixed Neem (*Azadirachta indica*) and Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Oils into Biolubricants: a green biocatalytic approach. **Acs Omega**, v. 10, n. 21, p. 21361-21376, 20 maio 2025.

SINGH, Yashvir; FAROOQ, Abid; RAZA, Aamir; MAHMOOD, Muhammad Arif; JAIN, Surbhi. Sustainability of a non-edible vegetable oil based bio-lubricant for automotive applications: a review. **Process Safety And Environmental Protection**, v. 111, p. 701-713, out. 2017.

SHELDON, Roger A.; VAN PELT, Sander. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 27 mar. 2013.

SOUSA, Isamayra Germano de; MOTA, Gabrielly Ferreira; CAVALCANTE, Antônio Luthierre Gama; ROCHA, Thales Guimarães; SOUSA, Patrick da Silva; ALEXANDRE, Jeferson Yves Nunes Holanda; SOUZA, José Erick da Silva; SIMÃO NETO, Francisco; CAVALCANTE, Francisco Thálysson Tavares; LOPES, Ada Amélia Sanders. Renewable processes of synthesis of biolubricants catalyzed by lipases. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, v. 11, n. 1, p. 109006, fev. 2023.

SO, Kenny K. Y.; DUNCAN, Robert W.. Breeding Canola (*Brassica napus* L.) for Protein in Feed and Food. **Plants**, v. 10, n. 10, p. 2220, 19 out. 2021.

SOUZA, José E. S.; MONTEIRO, Rodolpho R. C.; ROCHA, Thales G.; MOREIRA, Katerine S.; CAVALCANTE, Francisco T. T.; BRAZ, Ana K. de Sousa; SOUZA, Maria C. M. de; SANTOS, José C. S. dos. Sonohydrolysis using an enzymatic cocktail in the preparation of free fatty acid. **3 Biotech**, v. 10, n. 6, p. 1-10, 15 maio 2020.

SOUZA, Ticiane C. de; FONSECA, Thiago de S.; COSTA, Jessyca A. da; ROCHA, Maria Valderez Ponte; MATTOS, Marcos Carlos de; FERNANDEZ-LAFUENTE, Roberto; GONÇALVES, Luciana R.B.; SANTOS, José C. S. dos. Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: application to the chemoenzymatic production of (r)-indanol. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 130, p. 58-69, ago. 2016.

SUBROTO, Edy. Characteristics, Purification, and the Recent Applications of Soybean Oil in Fat-Based Food Products: a review. **International Journal Of Emerging Trends In Engineering Research**, v. 8, n. 7, p. 3003-3011, 25 jul. 2020.

TEBAS, Saulo de Oliveira Gentil; BARAÑANO, Audrei Giménez; PINHEIRO, Patrícia Fontes; LACERDA JÚNIOR, Valdemar. Mild conditions in the transesterification reaction of babassu oil and purified fusel oil. **Chemical Engineering Communications**, v. 208, n. 3, p. 432-440, 7 jan. 2020.

TIAN, Miao; WANG, Zhiyuan; FU, Junying; LV, Pengmei; LIANG, Cuiyi; LI, Zhibing; YANG, Lingmei; LIU, Tao; LI, Ming; LUO, Wen. N-glycosylation as an effective strategy to enhance characteristics of *Rhizomucor miehei* lipase for biodiesel production. **Enzyme And Microbial Technology**, v. 160, p. 110072, out. 2022.

TIAN, Mingke; BAI, Yuchen; TIAN, Hongyu; ZHAO, Xuebing. The Chemical Composition and Health-Promoting Benefits of Vegetable Oils—A Review. **Molecules**, v. 28, n. 17, p. 6393, 1 set. 2023.

THOMPSON, Corey N.; HENDON, Bralíe R.; MISHRA, Deepika; RIEFF, Jacob M.; LOWERY, Cindy C.; LAMBERT, Kimberly C.; WITT, Travis W.; OSWALT, Steven J.; BECHERE, Efre; SMITH, C. Wayne. Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutants with reduced levels of palmitic acid (C16: 0) in seed lipids. **Euphytica**, v. 215, n. 6, p. 112-215, 27 maio 2019.

TSUJITA, T; NINOMIYA, H; OKUDA, H. P-nitrophenyl butyrate hydrolyzing activity of hormone-sensitive lipase from bovine adipose tissue. **Journal Of Lipid Research**, v. 30, n. 7, p. 997-1004, jul. 1989.

UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR E BIOENERGIA. *Sobre a ÚNICA*. 2022. Disponível em: <https://unica.com.br/sobre-a-unica/>. Acesso em: 20 jan. 2025.

UPPAR, Rajendra; DINESHA, P.; KUMAR, Shiva. Yield optimization of nonedible vegetable oil-based bio-lubricant using design of experiments. **Environment, Development And Sustainability**, v. 26, n. 11, p. 29557-29582, 11 fev. 2024.

UPPAR, Rajendra; DINESHA, P.; KUMAR, Shiva. A critical review on vegetable oil-based bio-lubricants: preparation, characterization, and challenges. **Environment, Development And Sustainability**, v. 25, n. 9, p. 9011-9046, 20 set. 2022.

UPPENBERG, Jonas; HANSEN, Mogens Trier; PATKAR, Shamkant; JONES, T. Alwyn. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. **Structure**, v. 2, n. 4, p. 293-308, abr. 1994.

VIVEK, K.; SANDHIA, G.s.; SUBRAMANIYAN, S.. Extremophilic lipases for industrial applications: a general review. **Biotechnology Advances**, v. 60, p. 108002, nov. 2022.

WANG, R.; SCHUMAN, T. P.. Vegetable oil-derived epoxy monomers and polymer blends: a comparative study with review. **Express Polymer Letters**, v. 7, n. 3, p. 272-292, 2013.

ZS LUBES, ZS Lubes – Specialists in biodegradable lubricants Disponível em: <https://zslubes.com>. Acessado em: 15 de julho de 2025.

ZDARTA, Jakub; MEYER, Anne; JESIONOWSKI, Teofil; PINELO, Manuel. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: characteristics, properties, practical utility. **Catalysts**, v. 8, n. 2, p. 92, 24 fev. 2018.

ZDARTA, Jakub; KLAPISZEWSKI, Lukasz; JEDRZAK, Artur; NOWICKI, Marek; MOSZYNSKI, Dariusz; JESIONOWSKI, Teofil. Lipase B from *Candida antarctica* Immobilized on a Silica-Lignin Matrix as a Stable and Reusable Biocatalytic System. **Catalysts**, v. 7, n. 1, p. 14, 31 dez. 2016.

ZDIENNICKA, Anna; SZYMCZYK, Katarzyna; JAŃCZUK, Bronisław; LONGWIC, Rafał; SANDER, Przemysław. Surface, Volumetric, and Wetting Properties of Oleic, Linoleic, and Linolenic Acids with Regards to Application of Canola Oil in Diesel Engines. **Applied Sciences**, v. 9, n. 17, p. 3445, 21 ago. 2019.