



UNILAB

**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFRO-BRASILEIRA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPPG)
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
(IEDS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENERGIA E AMBIENTE (PGEA)**

MICHAEL PABLO FRANÇA SILVA

**SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE PEQUI ATRAVÉS DE
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS CONTENDO CALB
E EVERSA® TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS**

REDENÇÃO – CEARÁ

2023

MICHAEL PABLO FRANÇA SILVA

SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE PEQUI ATRAVÉS DE
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS CONTENDO CALB
E Eversa® TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre.

Linha de Pesquisa 1: Processos Sustentáveis, Inovação e Difusão Tecnológica. **Subárea:** Processos Químicos.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza.

Coorientadora: Prof. Dra. Artemis Pessoa Guimarães.

REDENÇÃO – CEARÁ

2023

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
Sistema de Bibliotecas da UNILAB
Catalogação de Publicação na Fonte.

Silva, Michael Pablo França.

S586s

Síntese de biodiesel a partir do óleo de pequi através de biocatalisadores enzimáticos contendo CALB e Eversa® Transform 2.0 imobilizadas em nanopartículas magnéticas / Michael Pablo França Silva. - Redenção, 2023.

95f: il.

Dissertação - Curso de Mestrado Acadêmico Em Energia E Ambiente, Programa De Pós-graduação Em Energia E Ambiente, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Redenção, 2023.

Orientadora: Prof. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza.

Coorientadora: Prof. Dra. Artemis Pessoa Guimarães.

1. Biodiesel. 2. Pequi. 3. Hidroesterificação. 4. Candida antarctica do tipo B (CALB). 5. Eversa®Transform 2.0. I. Título

CE/UF/Dsibiuni

CDD 665.5384

MICHAEL PABLO FRANÇA SILVA

**SÍNTESE DE BIODIESEL A PARTIR DO ÓLEO DE PEQUI ATRAVÉS DE
BIOCATALISADORES ENZIMÁTICOS CONTENDO CALB
E EVERSA® TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADAS EM NANOPARTÍCULAS
MAGNÉTICAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Energia e Ambiente, da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre. **Linha de Pesquisa 1:** Processos Sustentáveis, Inovação e Difusão Tecnológica. **Subárea:** Processos Químicos.

Aprovado em: 27/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza (Orientadora)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof. Dra. Artemis Pessoa Guimarães (Coorientadora)
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof. Dr. Tiago Lima de Albuquerque
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Igor Tadeu Lazzarotto Bresolin
Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP

Dedico este trabalho ao Dono de toda ciência,
sabedoria e poder: Deus!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos para que eu pudesse realizar mais uma conquista. A Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, José Vicente e Francisca Nunes, que mesmo distantes (geograficamente) torcem e apoiam minhas decisões.

Ao meu irmão Yuri França, pelo apoio.

À minha esposa Jakeline Rodrigues pelo amor, incentivo, parceria e compreensão.

À minha filha Cecília Rodrigues, por transmitir alegria, motivação e amor por onde passa.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Cristiane Martins de Souza pela confiança em mim depositada, pela orientação e compartilhamento de ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

À minha coorientadora Profa. Dra. Artemis Pessoa Guimarães pela disponibilidade e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. José Cleiton, pelo apoio e ensinamentos.

À Profa. Dra. Raquel Petrilli pela disponibilidade, gentileza, ensinamentos e apoio nas caracterizações realizadas no Laboratório de Físico-Química da Unilab.

Ao M.e. Brandão, pela parceria, amizade, paciência e serenidade em repassar seus conhecimentos tanto da parte teórica como das práticas experimentais no laboratório.

À Profa. Dra. Juliana Serpa, pela disponibilidade, generosidade e paciência para compartilhar seus conhecimentos tanto da parte teórica como das práticas experimentais laboratoriais.

Aos colegas Caike, Érick e Jean pelos ensinamentos repassados que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

Ao amigo Edirlan e amiga Valdenusa da turma 2020.1 do PGEA Unilab, pela amizade, companheirismo e pelos incentivos recíprocos para a realização do trabalho.

À Eng. Dra. Sandriely Sonaly pelo apoio.

À equipe de serviços gerais e vigilância patrimonial da Unilab do Campus das Auroras.

A todos que de forma direta e indireta ajudaram para a realização deste trabalho.

Por fim, à toda equipe de docentes, técnicos administrativos em educação e terceirizados do Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (PGEA/Unilab).

“Somente se aproxima da perfeição quem a procura com constância, sabedoria e, sobretudo, humildade.” (Jigoro Kano)

RESUMO

A preocupação com a emissão de poluentes atmosféricos oriundos de combustíveis fósseis utilizados em motores de combustão interna vem despertando cada vez mais o interesse de pesquisas na procura de matérias-primas que sejam sustentáveis e menos nocivas ao meio ambiente. Dentre as alternativas está o biodiesel, biocombustível potencial para ser uma alternativa ao diesel mineral, que possui características técnicas ambientalmente corretas. Dentre a gama de matérias-primas utilizadas com potencial para a síntese do biodiesel, podemos citar o óleo vegetal de pequi, que é um fruto típico encontrado no cerrado brasileiro pertencente à família das *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar*, sendo que este possui 16 espécies de ocorrência nas Américas Central e do Sul. O objetivo do estudo foi investigar a viabilidade de produção de biodiesel a partir da hidroesterificação do óleo de pequi utilizando biocatalisadores enzimáticos na forma livre e imobilizada em suporte de nanopartículas magnéticas de ferro como uma das alternativas para produção de biocombustíveis. O óleo de pequi bruto foi hidrolisado para a formação de mais ácidos graxos, sendo posteriormente esterificado com álcool de cadeia curta utilizando rota enzimática na proporção molar de 1:1, agitação de 150 rpm, temperatura da reação de 37 °C, biocatalisadores enzimáticos, sendo as lipases CALB e Eversa® Transform 2.0 testados individualmente nas suas formas livres, com tempos reacionais de 2, 4, 6 e 8 horas; e imobilizadas em nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) com quantidade equivalente a 80 UpNPBg^{-1} de catalisador e tempo reacional de 1h e 8h por ciclo. O melhor resultado da conversão catalítica utilizando os biocatalisadores na forma livre no meio reacional foi de 79,17% (8h) com Eversa® Transform 2.0 e metanol. A máxima conversão dos três ciclos de reação consecutivos para 1 hora mostra a manutenção da produção dos ésteres com resultados em média de 50,2% utilizando CALB-NPM em etanol. Já para o ciclo de 8 horas, a máxima conversão dos três ciclos consecutivos foi de 88,44% usando CALB-NPM e etanol com queda considerável na conversão já no segundo ciclo. Entretanto, para a Eversa® Transform 2.0-NPM com metanol houve manutenção das conversões no ciclo com média de 81%. Os resultados foram considerados promissores, com isso, novos estudos devem ser realizados para aperfeiçoamento da técnica utilizada, pois, o estudo apresentou valores de teores de conversões de ésteres próximos ao exigido pela Resolução ANP N° 45 de 25/08/2014 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.

Palavras-chave: Biodiesel. Pequi. Hidroesterificação. *Candida antarctica* do tipo B (CALB). Eversa® Transform 2.0.

ABSTRACT

The concern with the emission of atmospheric pollutants from fossil fuels used in internal combustion engines has increasingly awakened the interest of research in the search for raw materials that are sustainable and less harmful to the environment. Among the alternatives is biodiesel, a potential biofuel to be an alternative to mineral diesel, which has environmentally correct technical characteristics. Among the range of raw materials used with potential for the synthesis of biodiesel, we can mention pequi vegetable oil, which is a typical fruit found in the Brazilian cerrado belonging to the *Caryocaraceae* family and the *Caryocar* genus, which has 16 species occurring in Central and South America. The objective of the study was to investigate the feasibility of producing biodiesel from the hydroesterification of pequi oil using enzymatic biocatalysts in free and immobilized form on support of magnetic iron nanoparticles as one of the alternatives to produce biofuels. Crude pequi oil was hydrolyzed to form more fatty acids, and subsequently esterified with short-chain alcohol using an enzymatic route at a molar ratio of 1:1, agitation at 150 rpm, reaction temperature of 37 °C, enzymatic biocatalysts, with the lipases CALB and Eversa® Transform 2.0 individually tested in their free forms, with reaction times of 2, 4, 6 and 8 hours; and immobilized on magnetic iron nanoparticles (Fe_3O_4) with an amount equivalent to 80 UpNPB g^{-1} of catalyst and reaction time of 1h and 8h per cycle. The best result of the catalytic conversion using biocatalysts in free form in the reaction medium was 79.17% (8h) with Eversa® Transform 2.0 and methanol. The maximum conversion of the three consecutive reaction cycles for 1 hour shows the maintenance of ester production with average results of 50.2% using CALB-NPM in ethanol. As for the 8-hour cycle, the maximum conversion of the three consecutive cycles was 88.44% using CALB-NPM and ethanol, with a considerable drop in conversion already in the second cycle. However, for Eversa® Transform 2.0-NPM with methanol, conversions were maintained in the cycle with an average of 81%. The results were considered promising, therefore, new studies should be carried out to improve the technique used, since the study presented values of esters content close to those required by ANP Resolution N°. 45 of 08/25/2014 of the Agency National Petroleum, Natural Gas and Biofuels.

Keywords: Biodiesel. Pequi. Hydroesterification. *Candida antarctica* type B (CALB). Eversa® Transform 2.0.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01 – LINHA DO TEMPO DE AMPLIAÇÃO E PERSPECTIVA OBRIGATÓRIA DO PERCENTUAL DE BIODIESEL NA PRODUÇÃO DE ÓLEO DIESEL TIPO B ESTABELECIDO NA RESOLUÇÃO CNPE Nº 16, DE 29/10/2018	22
FIGURA 02 – PRODUÇÃO ACUMULADA DE BIODIESEL (M ³) NO BRASIL NO ANO DE 2021	23
FIGURA 03 – MATÉRIA-PRIMA UTILIZADA PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL (M ³) NO BRASIL NO ANO DE 2021.....	25
FIGURA 04 – MAPA DE OCORRÊNCIA DO PEQUI NO BRASIL.....	26
FIGURA 05 – (A) PEQUI INTEIRO (EXOCARPO). (B) PEQUI SECCIONADO (AMÊNDOAS E MESOCARPO EXTERNO). (C) AMÊNDOA COM CORTE LONGITUDINAL (AMÊNDOA E ENDOCARPO COM ESPINHOS)	27
FIGURA 06 – ESTRUTURA MORFOLÓGICA DO FRUTO DO PEQUI.....	27
FIGURA 07 – SÉRIE HISTÓRICA DA PRODUÇÃO DE PEQUI NO BRASIL ATÉ 2020	28
FIGURA 08 – ACUMULADO DA PRODUÇÃO DE PEQUI POR ESTADO NO BRASIL EM 2020	29
FIGURA 09 – ESQUEMA DA TRANSESTERIFICAÇÃO DE UM TRIGLICERÍDEO GENÉRICO COM METANOL	33
FIGURA 10 – MECANISMO DE TRANSESTERIFICAÇÃO CATALISADO POR ÁCIDOS	35
FIGURA 11 – REAÇÕES SECUNDÁRIAS QUE PODEM OCORRER DURANTE A TRANSESTERIFICAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS	36
FIGURA 12 – ESQUEMA DO PROCESSO DE HIDROESTERIFICAÇÃO	38
FIGURA 13 – REAÇÃO DE HIDROESTERIFICAÇÃO – (A) HIDRÓLISE DO TRIACILGLICEROL. (B) ESTERIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES	39
FIGURA 14 – SIMULAÇÃO DA ESTRUTURA MOLECULAR DE UM ÓLEO E DE UMA GORDURA	43
FIGURA 15 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO INTERFACIAL DE LIPASES EM INTERFACES HIDROFÓBICAS	46
FIGURA 16 – TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	51
FIGURA 17 – ESTRUTURA CRISTALINA DA MAGNETITA	53
FIGURA 18 – AMOSTRAS EM TRIPLICATA DE ÓLEO DE PEQUI BRUTO E HIDROLISADO TITULADOS COM NAOH 0,1 MOLAR.....	57
FIGURA 19 – ETAPAS DA HIDRÓLISE: (A) AQUECIMENTO INICIAL COM CONTROLE DE AGITAÇÃO; (B) ÓLEO COM SOLUÇÃO AQUOSA DE NAOH 20 %; (C) DECANTAÇÃO INICIAL APÓS INSERÇÃO DA SOLUÇÃO AQUOSA DE ÁCIDO SULFÚRICO (H ₂ SO ₄) 6 MOL L ⁻¹ ; (D) LAVAGEM DO ÓLEO HIDROLISADO	61

FIGURA 20 – ESQUEMA DA SÍNTESE DO SUPORTE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA (Fe ₃ O ₄).	62
FIGURA 21 – ESQUEMA DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA.....	63
FIGURA 22 – ESQUEMA DE ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA HETEROGÊNEA	65
FIGURA 23 – ESQUEMA DE COMBINAÇÕES PARA SÍNTESES DE BIODIESEL	65
FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO DE PEQUI BRUTO.	69
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO DE PEQUI HIDROLISADO.....	70
FIGURA 26 – SÍNTESE DE ÉSTERES UTILIZANDO ÓLEO DE PEQUI HIDROLISADO E OS ÁLCOOIS ETÍLICO (1:1) E METANOL (1:1) COMO SISTEMAS ALCOÓLICOS E AS ENZIMAS CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0, AMBAS, NA FORMA LIVRE: (A) ENZIMA CALB COM (■) ETANOL E (●) METANOL; (B) ENZIMA EVERSA® TRANSFORM 2.0 COM (■) ETANOL E (●) METANOL; (C) ENZIMAS (Δ) CALB E (O) EVERSA® TRANSFORM 2.0 COM ETANOL; (D) ENZIMAS (Δ) CALB E (O) EVERSA® TRANSFORM 2.0 COM METANOL.....	73
FIGURA 27 – RENDIMENTO DO BIODIESEL E REUTILIZAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA: (A) ENZIMA CALB COM (■) ETANOL E (●) METANOL; (B) ENZIMA EVERSA® TRANSFORM 2.0 COM (■) ETANOL E (●) METANOL; REAÇÃO CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÓLEO/ÁLCOOL (1:1); DOSAGEM DE CATALISADOR, ATT= 80 U.G ⁻¹ ; TEMPO DE REAÇÃO: CICLOS DE 1 H CADA, TOTALIZANDO 3 H NO FINAL; TEMPERATURA DE REAÇÃO, 37 °C.....	75
FIGURA 28 – RENDIMENTO DO BIODIESEL E REUTILIZAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA: (A) ENZIMA CALB COM (■) ETANOL E (●) METANOL; (B) ENZIMA EVERSA® TRANSFORM 2.0 COM (■) ETANOL E (●) METANOL; REAÇÃO CONDIÇÕES: RAZÃO MOLAR ÓLEO/ÁLCOOL (1:1); DOSAGEM DE CATALISADOR, ATT= 80 U.G ⁻¹ ; TEMPO DE REAÇÃO: CICLOS DE 8 H CADA, TOTALIZANDO 24 H NO FINAL; TEMPERATURA DE REAÇÃO, 37 °C.....	77
FIGURA 29 – COMPARATIVO DOS RENDIMENTOS OBTIDOS DAS REAÇÕES DE ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES DO ÓLEO HIDROLISADO DE PEQUI NA TEMPERATURA DE 37°C, AGITAÇÃO DE 150 RPM E 8H COM BIOCATALISADORES CALB (A) E EVERSA TRANSFORM 2.0 (B) NAS FORMAS LIVRES E IMOBILIZADOS EM NPM COM ETANOL E METANOL.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 – PRINCIPAIS PARÂMETROS DE ESPECIFICAÇÃO DO BIODIESEL NO BRASIL	32
TABELA 02 – ESTRUTURA, NOMENCLATURA, NOME SISTEMÁTICO E FÓRMULA MOLECULAR DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS DE OCORRÊNCIA NATURAL.....	43
TABELA 03 – COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DA CALB.....	48
TABELA 04 – COMPARATIVO DOS RESULTADOS DAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DO ÓLEO DE PEQUI COM OUTROS ÓLEOS VEGETAIS	67
TABELA 05 – ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE PEQUI BRUTO OBTIDOS POR CG/FID	70
TABELA 06 – ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE PEQUI HIDROLISADO OBTIDOS POR CG/FID	71
TABELA 07 – TEORES DE CONVERSÕES OBTIDOS ATRAVÉS DE SÍNTESE DE ESTERIFICAÇÃO ATRAVÉS DE BIOCATALISADORES CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0 LIVRES NO MEIO REACIONAL.....	72
TABELA 08 – TEORES DE CONVERSÕES OBTIDOS ATRAVÉS DE SÍNTESE DE ESTERIFICAÇÃO ATRAVÉS DE BIOCATALISADORES CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADOS EM NPM NO TEMPO DE 1H	75
TABELA 09 – TEORES DE CONVERSÕES OBTIDOS ATRAVÉS DE SÍNTESE DE ESTERIFICAÇÃO ATRAVÉS DE BIOCATALISADORES CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0 IMOBILIZADOS EM NPM NO TEMPO DE 8H	77

LISTA DE SIGLAS

Å	Angstrom
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGL	Ácidos graxos livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
AOCS	American Oil Chemists Society
APTES	Aminopropiltriétoxisilano
Asn	Asparagina
Asp	Aspartato
ASTM	American Society of Testing and Materials
CALB	<i>Candida antarctica</i> do tipo B
CALB-NPM	Catalisador <i>Candida antarctica</i> do tipo B imobilizado com nanopartículas magnéticas de ferro
CEIB	Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel
CFC	Cúbico de Face Centrada
CG-FID	Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama
CNPE	Conselho Nacional de Política Energética
cSt	Centistokes
EC	Enzyme Commission
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPE	Empresa de Pesquisa Energética
g	Gramas
GLU	Glutaraldeído
Glu	Glutamato
His	Histidina
IA	Índice de acidez
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ISO	International Organization for Standardization
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

kDa	Kilodaltons (massa molecular de proteínas)
kg	Quilograma
L	Litro
M	Mol
m	Metros
m ³	Metros cúbicos
ml	Mililitros
MM	Massa Molecular
mmol L ⁻¹	Milimoles por litro
nm	Nanômetro
NUTEC	Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará
OPB	Óleo de pequi bruto
OPH	Óleo de pequi hidrolisado
PET	Politereftalato de Etileno.
pH	Potencial Hidrogeniônico
pI	Ponto Isoelétrico
p-NP	p-nitrofenol
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
p-NPB	p-nitrophenilbutirato
rpm	Rotações por minuto
S	Segundo
Ser	Serina
SFS	Saybolt Furol Seconds
SSU	Saybolt Universal Seconds
T	Toneladas
Triptofano	Trp
TU	Teor de Umidade
Up/g ⁻¹	Atividade da enzima
US\$	Dólar Americano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 CONTEXTUALIZAÇÃO	17
1.2 JUSTIFICATIVA	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
3.1 BIODIESEL NO BRASIL	21
3.2 MATÉRIAS-PRIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIODIESEL	24
3.2.1 PEQUI	26
3.2.2 FORMAS DE EXTRAÇÃO DO ÓLEO DE PEQUI	29
3.3 ESPECIFICAÇÃO DO BIODIESEL	31
3.4 PRINCIPAIS PROCESSOS DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL	32
3.4.1 TRANSESTERIFICAÇÃO	33
3.4.1.1 CATÁLISE QUÍMICA ÁCIDA	34
3.4.1.2 CATÁLISE QUÍMICA BÁSICA	35
3.4.1.3 CATÁLISE ENZIMÁTICA	37
3.4.2 HIDROESTERIFICAÇÃO	38
3.4.2.1 HIDRÓLISE	40
3.4.2.2 ESTERIFICAÇÃO	41
3.4.2.3 ÁCIDOS GRAXOS	41
3.5 ENZIMAS	44
3.5.1 LIPASES	45
3.5.1.1 CANDIDA ANTARCTICA (CALB)	47
3.5.1.2 Eversa® TRANSFORM 2.0.....	49
3.5.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	50
3.5.2.1 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	53
4 MATERIAIS E MÉTODOS	56
4.1 MATERIAIS	56
4.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO BRUTO DE PEQUI.....	56
4.2.1 ÍNDICE DE ACIDEZ.....	56
4.2.2 TEOR DE UMIDADE.....	58

4.2.3 VISCOSIDADE CINEMÁTICA À 40°C	58
4.2.4 MASSA ESPECÍFICA À 20°C.....	59
4.2.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS (%) POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG/FID)	60
4.3 HIDRÓLISE DO ÓLEO DE PEQUI PARA OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS	60
4.4 SÍNTESE DO SUPORTE DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA (Fe ₃ O ₄)	62
4.4.1 TRATAMENTO DO SUPORTE COM G-AMINOPROPILTRIETOXISILANO (APTES).....	62
4.4.2 RETICULAÇÃO COM SOLUÇÃO DE GLUTARALDEÍDO (GLU).....	63
4.4.3 IMOBILIZAÇÃO DA CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0 AO SUPORTE	63
4.4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	64
4.5 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA HETEROGÊNEA	64
4.6 ESTERIFICAÇÃO ENZIMÁTICA HOMOGÊNEA	65
4.7 DETERMINAÇÃO DE CONVERSÃO DE ÉSTERES POR ÍNDICE DE ACIDEZ	66
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO ÓLEO DE PEQUI	67
5.1.1 DETERMINAÇÃO DO PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS (%) POR CROMATOGRAFIA GASOSA (CG/FID).....	69
5.2 CONVERSÃO DO BIODIESEL ETÍLICO E METÍLICO DE ÓLEO DE PEQUI HIDROLISADO COM AS ENZIMAS LIVRES CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0	72
5.3 CONVERSÃO HETEROGÊNEA DO ÓLEO DE PEQUI HIDROLISADO COM AS ENZIMAS CALB E EVERSA® TRANSFORM 2.0 E REUTILIZAÇÃO DA LIPASE IMOBILIZADA.....	74
5.4 COMPARATIVO DO USO DA ENZIMA LIVRE X ENZIMA IMOBILIZADA.....	78
6 CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

A preocupação com a emissão de poluentes atmosféricos oriundos de combustíveis fósseis utilizados em motores de combustão interna vem despertando cada vez mais o interesse de pesquisas na procura de matérias-primas que sejam renováveis e menos nocivas ao meio ambiente. Com isso, os chamados biocombustíveis decorrentes de biomassa vêm sendo cada vez mais atraentes, aumentando a demanda de tecnologia nessa área. Neste contexto, surge o biodiesel, sendo uma possibilidade de alternativa ao diesel petroquímico (mineral) por ser um combustível biodegradável e não-tóxico, além de reduzir as emissões de gases do efeito estufa (OLIVEIRA et al., 2015). O biodiesel produzido a partir de óleos vegetais e gorduras animais podem fornecer reduções significativas no teor de monóxido de carbono (CO) e nas emissões de particulados e de hidrocarbonetos. O biodiesel oriundo do óleo de soja, por exemplo, pode reduzir as emissões do CO em 48%, de material particulado (MP) em 47%, de óxido de enxofre (SO_x) em 100% e dos hidrocarbonetos totais (HC) em até 67% (ROSA, 2009).

Biodiesel são compostos por ésteres de cadeia longa, obtidos por meio de reações de transesterificação entre óleos vegetais e, geralmente um álcool de cadeia curta, na presença de um catalisador, via rota química ou enzimática (livre ou imobilizada) (SOUSA, 2016).

Existe uma grande diversidade de matérias-primas oleaginosas encontradas no território brasileiro que podem ser aproveitadas visando à síntese de biodiesel, entre as quais podemos citar o óleo vegetal de pequi. O Pequi é um fruto típico do cerrado brasileiro pertencente à família das *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar*, possuindo 16 espécies de ocorrência nas Américas Central e do Sul. Nas áreas de cerrado da região nordeste do Brasil a espécie *Caryocar coriaceum* é a mais preponderante e geralmente são encontradas na chapada do Araripe no estado do Ceará, Pernambuco e Piauí (OLIVEIRA, 2010; RIBEIRO, 2010; FERREIRA, 2019). No território brasileiro, o Pequi possui importância econômica para a agricultura, principalmente nos estados do Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Pará, Piauí, Maranhão e Ceará. A região geográfica do cerrado é considerada o segundo maior bioma do Brasil e ocupa em torno de 24% do território nacional (OLIVEIRA, 2010; RIBEIRO, 2010).

1.2 Justificativa

Apesar do grande potencial lipídico encontrado no óleo do pequi, sendo assim considerada como uma interessante matéria-prima para produção de biodiesel, há escassez de estudos relacionados com esta biomassa, o que justifica a necessidade de mais pesquisas, incluindo a forma de exploração no contexto nacional, entre outros aspectos, visando à melhoria da produtividade, principalmente para a verificação de viabilidade técnica e econômica em escala industrial (SANTOS et al., 2013). Estudos indicam que o óleo do pequi possui bom potencial para produção de biocombustíveis e lubrificantes devido que este óleo apresenta características de atividades antioxidantes proveniente da presença de carotenoides em sua composição química. Esta característica é bastante importante no que diz respeito à produção de biodiesel (OLIVEIRA, 2010; FERREIRA, 2019).

A catálise por condições reacionais básicas para a produção do biodiesel é a mais utilizada industrialmente. Porém, essa rota apresenta problemas peculiares, como a complexa separação do catalisador ao final da reação, redução do rendimento e dificuldade de separação da glicerina do biodiesel e maior energia térmica para a efetividade do processo (MACEDO, 2014). A catálise por condições reacionais básicas para a produção do biodiesel é considerada uma prática ambientalmente incorreta e não se enquadra nos padrões de sustentabilidade, isto porque após a produção do biodiesel com catalisador básico, este deve ser removido, o que necessita de uma grande quantidade de água para a lavagem do biodiesel, gerando um efluente que contamina rios e cursos d'água (SOUSA, 2016).

Considerando que o uso de catalisadores por rota química básica é um problema por não ser uma prática ambientalmente correta, outras estratégias, que sejam mais sustentáveis, devem ser estabelecidas. Uma alternativa promissora é o emprego dos biocatalisadores. As lipases do tipo B de *Candida antarctica* (CALB) são enzimas que hidrolisam triglicerídeos, e que em meios com baixo teor de água são capazes de catalisar reações de esterificação, interesterificação e transesterificação (FARIAS, 2017), possuindo características de alta enantioseletividade e régio-seletividade comportamento estável em meio aquoso na faixa de pH de 3,5 a 9,5, e que, quando imobilizada, apresenta elevada estabilidade térmica na presença de solventes orgânicos, o que confere a viabilidade de sua utilização em processos químicos em altas temperaturas por longos tempos sem perdas importantes de sua atividade (SOUZA, 2013; VESCOVI, 2016; SANTOS, 2011).

Entretanto, as enzimas ainda são consideradas caras, principalmente para fins de atuação como biocatalisadores na produção em escala industrial do biodiesel. Com isso, diversas

pesquisas vêm sendo desenvolvidas na busca de lipases mais baratas. Diante disso, a Novozymes (Empresa Dinamarquesa) lançou em 2016 uma formulação líquida da lipase *Thermomyces lanuginosus* produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* com alta especificidade e atividade em condições brandas de processo, denominada comercialmente de Eversa® Transform 2.0 com características referentes à estabilidade térmica melhoradas em relação à primeira versão, a Eversa® Transform, lançada em 2014. Ambas as formulações apresentaram bons rendimentos (83%–97%) quando utilizadas em sua forma líquida (livre) na produção de biodiesel (PINHOLT et al., 2010). Uma imobilização adequada pode melhorar muitas propriedades, como estabilidade, atividade, seletividade ou especificidade, resistência a inibidores ou produtos químicos, e também aplicações como biocatalisador (FRAGA et al., 2019). No entanto, seu uso na forma imobilizada ainda é pouco explorado (MIRANDA, 2020).

Do ponto de vista ambiental, a imobilização enzimática visando a síntese de biodiesel torna-se bastante interessante no contexto da química verde, tendo em vista a possibilidade de sua reutilização, além da redução de custos para compostos de alto valor agregado (REMONATTO, 2017).

Porém, a utilização de enzimas como catalisadores homogêneos é limitada devido à dificuldade do processo de separação e recuperação do meio reacional. Essa problemática pode ser solucionada utilizando suportes para a imobilização enzimática que mantenham suas características catalíticas (FARIAS, 2017). Com isso, o estudo para desenvolvimento de novos suportes torna-se necessário devido ao crescente interesse em processos dependentes do uso de lipases imobilizadas, principalmente para fins de uso como catalisadores na produção de biodiesel (ISMAIL; BAEK, 2020). As propriedades das enzimas imobilizadas podem ser influenciadas pela escolha da técnica de imobilização, além do tipo de suporte, variações operacionais dos reatores e natureza do solvente (SOUZA, 2013).

A rota convencional para produção de biodiesel resulta em torno de 70% do custo devido ao número de etapas pela qual deve ser submetido para estar apto ao processo de transesterificação (GAMA; GIL; LACHTER, 2010). Com isso, este estudo analisou e comparou meios diferentes de produção de biodiesel utilizando óleo de pequi, uma vez que os resultados experimentais podem indicar qual o mais adequado para este tipo de matéria-prima. Dessa forma, se reduzirá e ao mesmo tempo, se conferirá maior conversão dos ácidos graxos livres em ésteres sintetizados, focando na redução do número de operações unitárias na produção industrial, simplificação da separação e purificação do biodiesel (OLIVEIRA et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a viabilidade técnica de produção de biodiesel a partir da hidroesterificação do óleo de pequi utilizando biocatalisadores enzimáticos na forma livre e imobilizada em suporte de nanopartículas magnéticas de ferro como uma das alternativas para produção de biocombustíveis.

2.2 Objetivos específicos

- Apresentar a caracterização físico-química do óleo de pequi bruto;
- Comprovar a transformação de triacilglicerídeos presentes no óleo de pequi bruto em ácidos graxos livres (AGL) pelo processo de hidrólise;
- Realizar reações de esterificação de óleo de pequi hidrolisado utilizando cada um dos álcoois primários (metanol e etanol), na presença de cada uma das enzimas (*Candida antarctica* tipo B e Eversa® Transform 2.0), nas formas livres e imobilizadas em nanopartículas magnéticas;
- Realizar um estudo de decaimento de atividade dos biocatalisadores através de ciclos repetitivos de reuso;
- Comparar os rendimentos das sínteses dos ésteres obtidos por esterificação;
- Comparar as conversões obtidas com os parâmetros legais exigidos pela Resolução ANP Nº 45 de 25.8.2014.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Biodiesel no Brasil

A inserção da utilização dos biocombustíveis no Brasil vem desde a década de 70, a priori, objetivando superar crises econômicas. Devido ao alto preço do petróleo, em 1983 o governo brasileiro, através do então Ministério da Indústria e Comércio, criou o Programa Nacional de Energia de Óleos Vegetais (Projeto OVEG) com o intuito de realizar pesquisas de adição de níveis de biodiesel puro ao diesel de origem mineral. Em 2002, foi criado o PROBIODIESEL que foi coordenado pelo Ministério da Ciência e Tecnologia visando mobilizar todos os setores envolvidos no desenvolvimento de biocombustíveis para avaliar a viabilidade técnica, econômica e socioambiental, entretanto, foi descontinuado, pois não priorizava a agricultura familiar, sendo ajustado posteriormente (RAMOS et al., 2011).

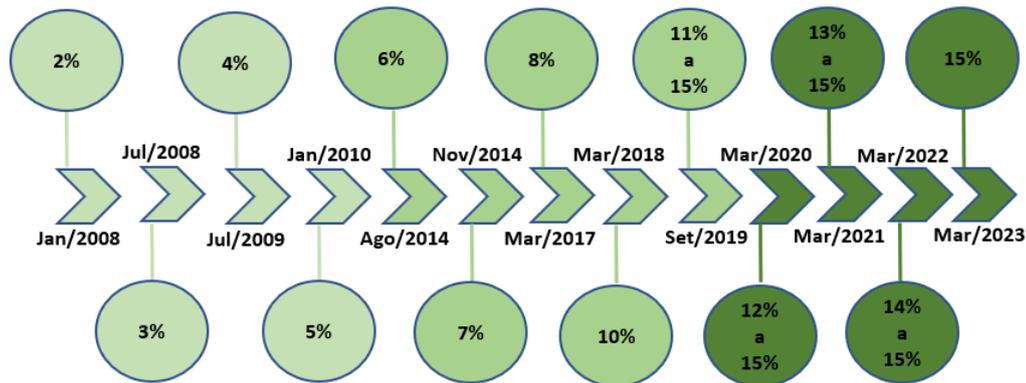
Em 2003 foram iniciados os primeiros estudos para a criação de uma política para a produção do biodiesel no Brasil através da Comissão Executiva Interministerial do Biodiesel (CEIB) e do Grupo Gestor (GG) pelo governo federal.

Em dezembro de 2004, foi lançado o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), objetivando introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira resultando na primeira fase, a definição de um arcabouço regulatório fomentando a inclusão social e o desenvolvimento regional. Experimentalmente, em 2004, teve início da mistura do biodiesel no diesel mineral denominado Diesel A, sendo o percentual da mistura de 2% no Diesel B (B2) (ANP, 2022).

A comercialização até então era opcional, porém, a partir da Lei nº 11.097/2005 em seu artigo 2º, tornou-se obrigatório a introdução do biodiesel na matriz energética brasileira, inicialmente, com mistura de 2% no diesel fóssil em 2008 (ANP, 2022).

No decorrer dos anos esse percentual foi ampliado pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE). A série histórica de ampliação e perspectiva do percentual de biodiesel na produção de óleo diesel tipo B, conforme estabelecido pela Lei nº 13.263, 23/03/2016 e pela Resolução CNPE nº 16, de 29/10/2018, é explanada na Figura 01.

Figura 01 – Linha do tempo de ampliação e perspectiva obrigatória do percentual de biodiesel na produção de óleo diesel tipo B estabelecido na Resolução CNPE n° 16, de 29/10/2018.



Fonte: ANP, 2021 (adaptado).

Com a pandemia da Covid-19, impactos no mercado brasileiro de combustíveis foram observados devido à redução da atividade econômica e da circulação de pessoas e mercadorias. As medidas adotadas para o enfrentamento da pandemia, principalmente as restrições de mobilidade, resultaram em grandes reduções na demanda de energia (LOSEKANN et al., 2020). Com isso, devido às incertezas no mercado de combustíveis por causa da pandemia, as distribuidoras de biocombustíveis solicitaram a não retirada dos volumes contratados no Leilão n° 71, além de isenção das penalidades contratuais. Com isso, a ANP postergou em 11 dias o Leilão n° 72 para uma melhor análise do contexto nacional na época. Após passado este período, a ANP decidiu por alterar as regras do certame, permitindo ao setor de distribuição a retirada de apenas 80% do valor adquirido sem a aplicação de multas, face ao percentual usual de 95% (EPE, 2020).

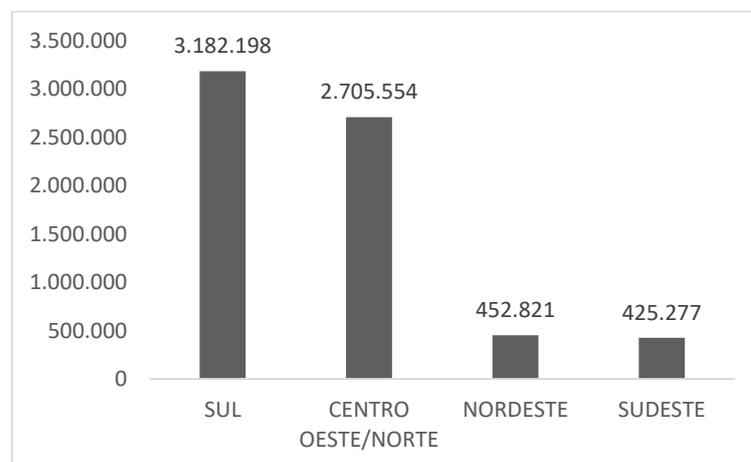
Como forma de mitigar os impactos na economia devido à pandemia de Covid-19 foram realizadas alterações dos percentuais obrigatórios de Biodiesel no óleo Diesel B ora estabelecidos pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) nos anos de 2020, 2021 e 2022. Com isso, através da Resolução n° 824, de 13 de agosto de 2020, ficou estabelecida a redução excepcional e temporária do percentual de mistura obrigatória do biodiesel ao óleo diesel dos atuais 12% (B12) para 10% (B10) no bimestre de setembro e outubro, sendo que a partir de novembro o incremento foi de 11% (B11) como medida de manutenção da continuidade do abastecimento nacional (ANP, 2020; EPE, 2022). Já no ano de 2021, até o final do primeiro trimestre ocorreu o aumento do percentual de mistura mandatório no diesel oriundo de petróleo para 13% em volume, sendo que em maio, este percentual foi reduzido para 10% (B10) e setembro para 12% (B12) e, por fim, 10% (B10) em novembro (EPE, 2022).

Em 2022, como forma de proteger os interesses do consumidor quanto ao preço, qualidade e oferta dos produtos, o Ministério de Minas e Energia (MME), através do CNPE, decide manter o percentual obrigatório de biodiesel no diesel em 10% (B10), sendo que, pelo cronograma estabelecido na resolução 16/2018 do próprio CNPE, em 2022, o percentual deveria subir para 14% (B14) a partir de março até atingir 15% (B15) em 2023. O MME justificou tal decisão baseada na implantação de medidas para a contenção do preço do diesel com a manutenção da Política Nacional de Biocombustíveis, RenovaBio, que é um programa do Governo Federal regulamentado através do Decreto nº 9.308, de 15 de março de 2018 para expandir a produção de biocombustíveis no Brasil, baseada na previsibilidade, na sustentabilidade ambiental, econômica e social, e compatível com o crescimento do mercado, conferindo previsibilidade, transparência, segurança jurídica e regulatória ao setor (EPBR, 2021). Para o ano de 2023, está prevista a mistura obrigatória de 15% (B15) a partir de abril, cumprindo assim, o cronograma estabelecido na resolução 16/2018 do CNPE (BIODIESELBR, 2023).

O crescente consumo de biodiesel no Brasil é favorecido pela política de adição deste combustível no diesel fóssil. Em relação à produção, o Brasil é o segundo maior fabricante de biodiesel do mundo, atrás apenas dos EUA. A matéria-prima mais usada para sua fabricação no Brasil ainda é o óleo de soja (BRASIL, 2022).

Até o ano de 2021, segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis - ANP (2022), existem 57 instalações produtoras de biodiesel, onde foram produzidos cerca de 6.765.850 m³ de biodiesel, com destaque para as regiões sul e centro-oeste/norte com uma produção de 3.182.198 m³ e 2.705.554 m³, respectivamente (Figura 02).

Figura 02 – Produção acumulada de biodiesel (m³) no Brasil no ano de 2021.



Fonte: ANP, 2022 (adaptado).

3.2 Matérias-primas para a produção de Biodiesel

O Biodiesel é uma mistura de ésteres de cadeia longa derivado de ácidos graxos obtidos, na sua grande maioria, por meio de reações de transesterificação em óleos vegetais ou gorduras animais com álcoois na presença de um catalisador (SANTIN, 2013). Possui propriedades similares ao óleo diesel mineral, sendo um produto atóxico, biodegradável e renovável, sendo considerado menos prejudicial ao meio ambiente quando comparado com o diesel, pois não é utilizado enxofre no processo produtivo (CANESIN et al., 2014). A seleção de matéria-prima é imprescindível para definição do custo-benefício do biodiesel produzido, pois influenciará em diversas variáveis como rendimento, composição e qualidade. Outro fator importante a ser considerado é a disponibilidade e fonte da matéria-prima a ser utilizada (SILVA, 2019).

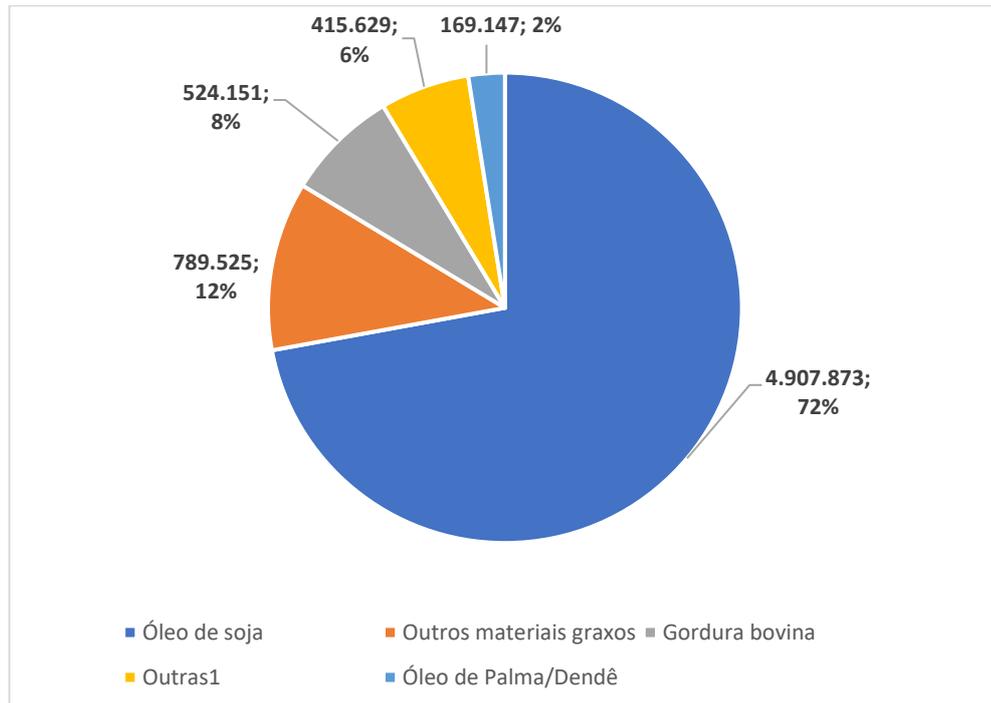
As principais matérias-primas utilizadas para a produção do biodiesel são os óleos vegetais e óleos e gorduras residuais de origem animal. Neste sentido, o Brasil possui um leque de diversidades regionais referentes a clima e solo, tornado uma condição satisfatória para o cultivo de várias oleaginosas, sendo a soja a mais produzida no país. Entretanto, a maior parte das oleaginosas com potencial para produzir biodiesel são de origem alimentícia podendo estes causar impactos negativos devido à concorrência e à escassez de alimentos, tornando-os mais caros (MELLO; FILHO; SILVA, 2020).

Lichston e Moreira (2016, p. 71) explanam as características desejáveis das matérias-primas com potencial de produção de biodiesel:

As características desejáveis para uma matéria-prima voltada para produção do biodiesel incluem adaptabilidade às condições do local de crescimento, viabilidade regional, alto teor de óleo, perfil graxo favorável, compatibilidade com a infraestrutura agrícola existente, baixa utilização de insumos agrícolas, uniformidade na maturação das sementes, mercados potenciais para os subprodutos e a capacidade de se desenvolver em áreas não agricultáveis. Dentre as culturas oleaginosas potenciais para biodiesel, podem-se citar várias adaptadas e/ou tolerantes às condições climáticas do semiárido nordestino.

A matéria-prima mais utilizada na produção do biodiesel no Brasil, segundo dados do painel dinâmico (matéria-prima) da ANP (2022) é o óleo de soja com cerca de 72 %, seguida da mistura por outros materiais graxos (gordura de frango, gordura de porco, óleo de algodão, óleo de colza/canola, óleo de fritura usado, óleo de milho, óleo de palmiste) com um percentual de 12 % (Figura 03).

Figura 03 – Matéria-prima utilizada para a produção de biodiesel (m³) no Brasil no ano de 2021.



Fonte: ANP, 2022 (adaptado).

Ainda que as regiões sul e centro-oeste e o norte do Brasil dominem a produção acumulada de biodiesel (m³), principalmente devido à oferta da soja, mistura por outros materiais graxo, melhor capacidade instalada, melhor planejamento da produção da agricultura familiar, a região nordeste, em termos de matéria-prima, possui alto potencial de crescimento de produção devido sua vasta diversidade de plantas oleaginosas, dentre elas podemos citar: pequi (*C. brasiliense*), babaçu (*O. barbosiana*), macaúba (*A. aculeata*), licuri (*S. coronata*), oiticica (*L. rigida*), buriti (*M. flexuosa*) e faveleira (*C. quercifolius*) que possuem características físico-químicas adequadas e que podem ser utilizadas na produção de energia (BELTRÃO; OLIVEIRA, 2007).

Segundo Oliveira et al. (2017, p. 06), nas regiões do Norte e Nordeste brasileiros há a produção possível de matérias-primas nos dendezaís (óleo de palmeiras nativas e plantio de dendê) e nos babaçuais (aproveitamento integral do coco). No semiárido nordestino destaca-se a produção em lavouras familiares de oleaginosas, principalmente a mamona (OLIVEIRA et al., 2017). Além da mamona, o algodão também é encontrado na região do semiárido nordestino (MELO, 2016).

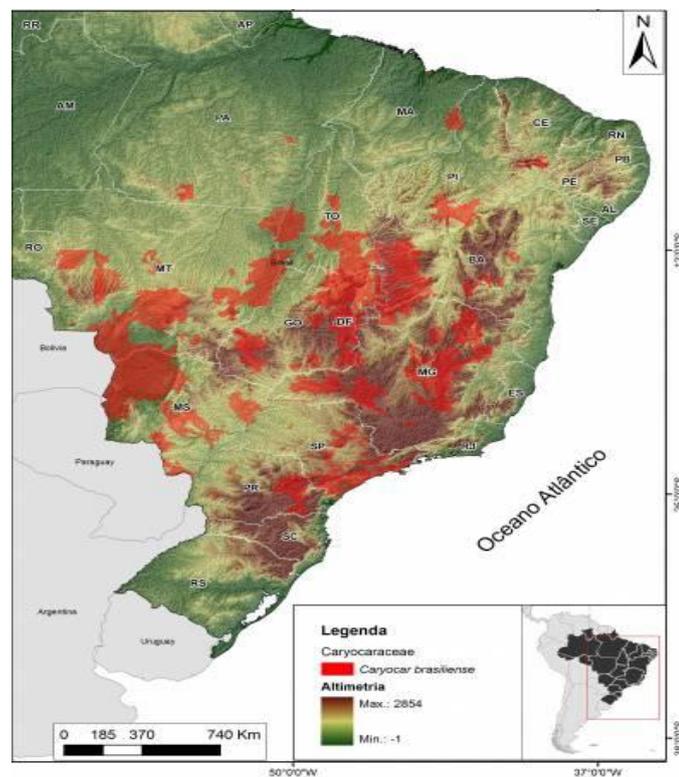
Dentre os nove estados que compõem a região nordeste brasileiro (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe), uma área

territorial está inserida no semiárido, apresentando secas constantes. Com isso, a maioria das culturas se adaptam a essas condições climáticas peculiares dessa região com menor exigência de água para irrigação (SIMONELLI; PIRES; SANTOS, 2017).

3.2.1 Pequi

Palavra oriunda do tupi, o pyqui significa casca espinhosa (py = casca e qui = espinho), provavelmente por ser uma característica peculiar do caroço do fruto, que é revestido por finos espinhos. É um fruto típico do cerrado brasileiro, o segundo maior bioma brasileiro, com uma extensão aproximada de 24% do território nacional (Figura 04). Em média, na região do cerrado é comum ocorrer 25 pequizeiros por hectare, podendo chegar a 100 em locais de vegetação fechada (OLIVEIRA, 2010). A produção do Pequi possui importância econômica para a agricultura regional, principalmente nos estados do Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais, Paraná, Pará, Piauí, Maranhão e Ceará (OLIVEIRA, 2010; RIBEIRO, 2010).

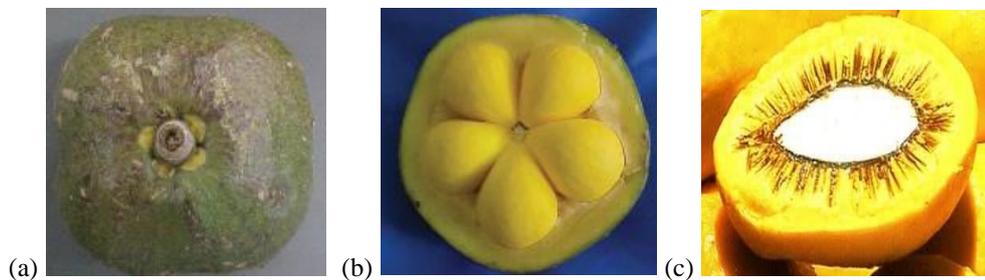
Figura 04 – Mapa de ocorrência do Pequi no Brasil.



Fonte: CNCFlora, 2012.

O pequi pertence à família das *Caryocaraceae* e ao gênero *Caryocar* sendo que geralmente apresenta entre 1 e 5 amêndoas, polpa amarelada contendo óleo, envolvendo uma fina camada de espinhos, um exocarpo de coloração verde, contendo em sua porção mais interna uma amêndoa de cor branca também rica em óleo (Figura 05). O gênero *Caryocar* possui 16 espécies que são pertencentes à família *Caryocaraceae* de ocorrência nas Américas Central e do Sul. Nas áreas de cerrado da região nordeste do Brasil a espécie *Caryocar coriaceum* é a mais preponderante e geralmente são encontradas na chapada do Araripe no estado do Ceará, Pernambuco e Piauí (OLIVEIRA, 2010; RIBEIRO, 2010; FERREIRA, 2019; PESSOA, 2013).

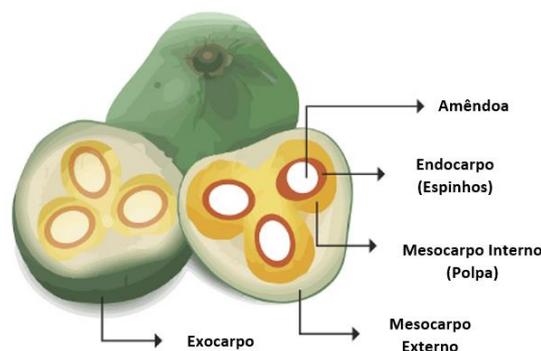
Figura 05 – (a) Pequi inteiro (exocarpo). (b) Pequi seccionado (amêndoas e mesocarpo externo). (c) Amêndoa com corte longitudinal (Amêndoa e endocarpo com espinhos).



Fonte: DEUS, 2008; MEDEIROS, 2009 (adaptado).

O fruto do pequi é composto por um exocarpo que protege todo o fruto, dentro e ligado a ele está o mesocarpo externo, ambos compreendendo a parte fibrosa que representa cerca de 84% do peso total do fruto. Rodeado pelo mesocarpo externo está a estrutura interna do fruto, onde podem ser encontradas de uma a cinco unidades. Esta parte é composta por um mesocarpo interno, de onde é extraída a polpa. No seu interior encontra-se o endocarpo (onde se concentram os espinhos) e na estrutura central existe uma amêndoa. Essas estruturas podem ser representadas na Figura 06.

Figura 06 – Estrutura morfológica do fruto do pequi.



Fonte: GUIMARÃES et al, 2022 (adaptado).

O pequi pode ser consumido simplesmente pelo cozimento em água e sal, como também pode ser associado a carnes, frangos, arroz, licores, doces, entre outros. Além da contribuição deste produto para a sobrevivência das comunidades em termos de alimentação, pode também ajudar na geração de renda para os agroextrativistas (OLIVEIRA, 2010).

Segundo Lima (2019, p. 07), os frutos de pequi (*Caryocar coriaceum*) oriundos do Maranhão e Piauí apresentam massa média do caroço de 25,9 g e da amêndoa de 1,8 g.

A produção do pequi é maior nos períodos de seca com safra entre os meses de novembro e fevereiro, dependendo da região, sendo que no período de chuva, sua frutificação é irregular e por isso, torna-se comprometida (PESSOA, 2013).

Baseados nos dados obtidos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2020, no Brasil, ocorreu um aumento significativo na produção de pequi em torno de 230% em comparação ao ano de 2014, e de 127% com em relação ao ano de 2019 (Figura 07). O aumento deve-se à atuação do Grupo de Trabalho, formado pela Companhia Nacional de Abastecimento (Conab) e IBGE, que a partir de contatos informados pela companhia, resultou na qualificação do levantamento de dados, realizado pelo instituto, e na elevação da estimativa de safra, devido ao pequi apresentar outras formas de comercialização agregando valor: polpa, conserva, castanha, óleo, farinha. Isso fez com que a cultura atingisse novos mercados mostrando uma tendência de crescimento de produção para os anos posteriores (CONAB, 2022).

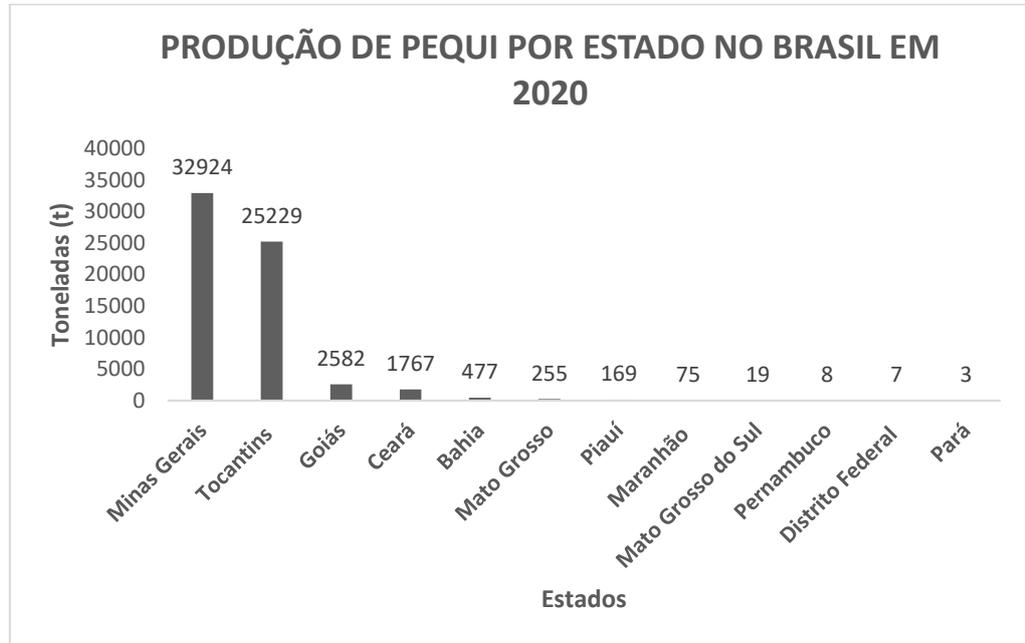
Figura 07 – Série histórica da produção de Pequi no Brasil até 2020.



Fonte: IBGE, 2022 (adaptado).

Em relação à produção acumulada de pequi por estado no ano de 2020, de acordo com os dados do IBGE (Figura 08), o estado de Minas Gerais (MG) detém cerca de 52% da produção nacional, seguido do estado de Tocantins (TO) com 40%.

Figura 08 – Acumulado da produção de Pequi por estado no Brasil em 2020.



Fonte: IBGE, 2022 (adaptado).

3.2.2 Formas de extração do óleo de pequi

As principais formas de extração do óleo de pequi são por: ação mecânica, solventes, cozimento e por extração supercrítica (RIBEIRO, 2010; OSTER, 2013).

Quadro 1 – Comparativo das formas de extração do óleo de pequi

FORMA DE EXTRAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
Mecânica	Secagem em estufas; amêndoas lavadas e prensadas; 1ª filtragem para separação do óleo da torta; 2ª filtragem do óleo; desvantagem: 15% do óleo fica retido na torta.
Solventes	Consiste na dissolução dos componentes da amostra em solvente líquido (hexano); despulpados e colocados em estufa para secagem; triturados em um multiprocessador; colocadas juntamente a solventes apolares em balões seguida de filtração e por fim, recuperação do solvente em estufa; desvantagens: o custo, a inflamabilidade e a toxicidade.
Cozimento	Processo artesanal; cozidos em recipientes metálicos contendo água por um tempo aproximado de 40 minutos; separados da água utilizando-se uma escumadeira despulpados e a polpa gerada é colocada novamente para cozimento; óleo liberado fique em suspensão; sobrenadante gerado é retirado com auxílio de uma colher; novamente é cozido em fogo baixo para a retirada ao máximo da água. Por fim, filtrado. Desvantagem: presença de contaminantes.
Supercrítica	Fluidos supercríticos atuam como solventes para a extração de óleos; a substância se encontra acima das suas temperaturas e pressões críticas; alta seletividade, pois é possível determinar condições ótimas para a extração do óleo utilizando-se da variação na temperatura e pressão na operação. Utilização de solvente atóxico e não inflamável (CO ₂) e baixas temperaturas Desvantagem: requer altas pressões no processo.

Fonte: RIBEIRO, 2010; OSTER, 2013; ALMEIDA et al., 2018; DEUS, 2008 (adaptado).

A quantidade obtida do óleo vegetal do pequi é dependente de alguns fatores como: fatores climáticos, espécie, colheita e modo de extração, sendo utilizado para diversas aplicações destacando-se a indústria de alimentos, aplicações medicinais, indústria de cosméticos e de biocombustíveis (OSTER, 2013).

Com base nos estudos da literatura, os quatro componentes majoritários na amêndoa de pequi (*Cariocar brasiliense*), são: os lipídeos (51,5%), as proteínas (25,3%), os carboidratos (8,3%) e a fibra alimentar (2,2%), apresentando um baixo teor de umidade (8,7%) e um teor elevado de minerais representado pelas cinzas (4,0%). Já com relação a composição química dos triglicerídeos referentes aos ácidos graxos, são encontrados os seguintes: ácido oleico (47-60%) e o ácido palmítico (31-40%) como componentes majoritários, ao passo que o ácido linoleico (0,96-2,38%) e o ácido esteárico (2,61-4%) são encontrados em menor quantidade na composição (Lima et. al., 2007 apud LIMA, 2019, p. 07; FERREIRA, 2019).

Com relação ao material graxo, altas concentrações de ácido oleico são encontrados (C18:1) tanto no óleo do caroço quanto da polpa, que devido as suas características peculiares de estabilidade oxidativa e presença de carotenoides, tornam-se fatores bastante interessantes para a produção do biodiesel (GUIMARÃES, 2015).

As características de atividade antioxidante observadas por substâncias constituintes do seu óleo tornam o uso do pequi bastante interessante para fins de produção de biodiesel, uma vez que o processo de oxidação é consideravelmente reduzido, sendo destaque em relação à maioria dos óleos vegetais que apresentam este processo como fator limitante. Com isso, o óleo de pequi eleva a estabilidade química dos bioprodutos para diversas aplicações específicas (FERREIRA, 2019).

3.3 Especificação do biodiesel

Ao longo dos anos a especificação do biodiesel produzido no Brasil tem sido ajustada através do alinhamento das normas nacionais com as internacionais garantindo uma posição de destaque mundial, onde juntamente com o etanol, fortalecem cada vez mais a participação dos biocombustíveis na matriz energética nacional (ANP, 2020).

Os parâmetros regulatórios para o controle das especificações do biodiesel no Brasil estão estabelecidos através da Resolução da ANP 45/2014 de 25.08.2014 (Tabela 1) (SILVA, 2019). A análise do produto deverá ser realizada em amostra representativa obtida segundo os métodos ABNT NBR 14883 - Petróleo e produtos de petróleo - Amostragem manual, ASTM D 4057 - Practice for Manual Sampling of Petroleum and Petroleum Products ou ISO 5555 - Animal and vegetable fat sand oils - Sampling. (ANP, 2014).

Tabela 1 – Principais parâmetros de especificação do biodiesel no Brasil.

CARACTERÍSTICA	UNIDADE	LIMITE	MÉTODO		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Massa específica a 20°C	kg/m ³	850 a 900	7148	1298	EN ISO 3675
			14065	4052	EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/kg	200,0	-	6304	EN ISO 12937
Ponto de fulgor, mín. (4)	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104
			-	-	
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15771	6584	EN 14105
			15908	-	EN 14106
			-		
Glicerol total, máx. (10)	% massa	0,25	15344	6584 (5)	EN 14105
			15908	-	
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103

Fonte: ANP, 2014 (adaptado).

O produto denominado “Biodiesel B100” deve cumprir as especificações físico-químicas determinadas pela ANP para que possa substituir total ou parcialmente o óleo diesel de petróleo em motores ciclo diesel automotivos.

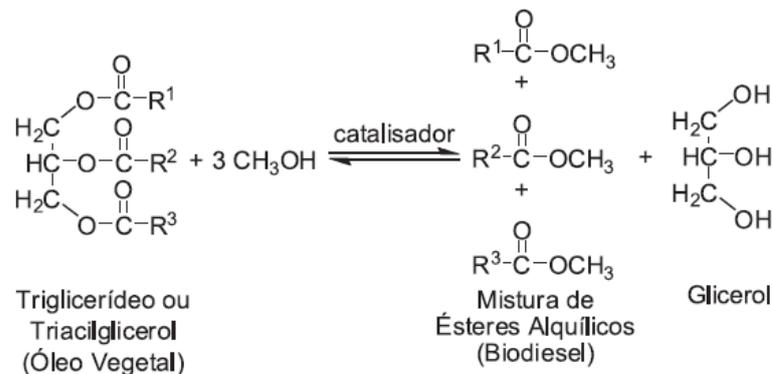
3.4 Principais processos de produção de biodiesel

Neste tópico, serão abordados os métodos de obtenção de biodiesel por transesterificação e a hidroesterificação.

3.4.1 Transesterificação

Atualmente, para fins de produção comercial de biodiesel, o processo mais comumente utilizado é a transesterificação, também conhecida como alcoólise e que encontra-se representada na Figura 09. Este processo consiste em triglicerídeos (triacilglicerol) reagindo com um álcool de cadeia curta com a presença de catalisadores e gerando ésteres alquílicos e também um subproduto denominado glicerol. Os catalisadores usados podem ser homogêneos (ácido ou básico) ou heterogêneos (ácido, básico ou enzimático) (VILLADIEGO; ROA; BENÍTEZ, 2015).

Figura 09 – Esquema da transesterificação de um triglicerídeo genérico com metanol.



Fonte: RINALDI et al., 2007.

O metanol e etanol são os dois álcoois mais utilizados no processo de transesterificação para obtenção de biodiesel (SANTIN, 2013). O metanol é mais reativo, sendo que os ésteres metílicos de ácidos graxos produzidos são menos viscosos e mais voláteis, além de ser mais barato quando comparado ao etanol. Entretanto, o metanol é mais tóxico que o etanol por ser derivado de gás natural oriundo de hidrocarbonetos. No geral, é necessária uma proporção molar de álcool a triglicerídeo de 3:1 para a obtenção de uma reação estequiométrica completa (ORTEGA; MERCADO; ARRIETA, 2014). Todavia, um amplo excesso de álcool, usualmente 6:1 ou 12:1, é utilizado para deslocar o equilíbrio químico a fim de maximizar a produção de ésteres graxos (RAMOS et al., 2011).

Existem dois mecanismos de reação de transesterificação classificados de homogêneos e heterogêneos. Ambos possuem princípios análogos quando utilizados sistemas básicos e ácidos baseados nas características nucleofílicas e eletrolíticas do grupo carbonila dos triacilglicerídeos e álcool, sendo que na catálise heterogênea a adsorção das espécies e a dessorção dos

produtos ocorrem na superfície do catalisador sólido (ORTEGA; MERCADO; ARRIETA, 2014). A catálise heterogênea ainda é pouco utilizada em escala industrial, mesmo apresentando algumas vantagens em relação aos catalisadores homogêneos, dentre elas: a reutilização do catalisador; menor consumo de água na purificação do biodiesel; melhor qualidade do glicerol e redução do impacto ambiental. Em contrapartida, esta rota catalítica é mais lenta e possui custo elevado dos catalisadores (GAMA; GIL; LACHTER, 2010).

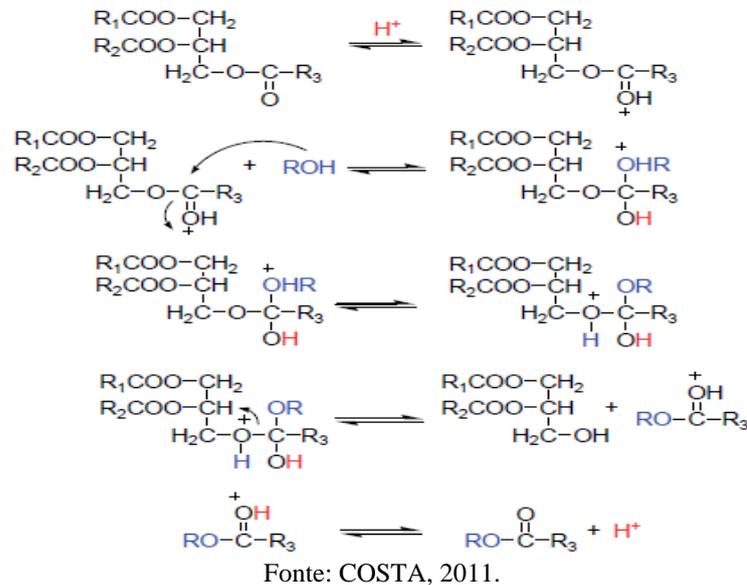
O processo de transesterificação provoca a redução da viscosidade e aumento da volatilidade do óleo, o que pode proporcionar um melhor desempenho em motores movidos a diesel. Alguns parâmetros devem ser observados para a realização do processo de transesterificação, sendo: a quantidade de ácidos graxos livres (AGL) nos óleos e gorduras; o efeito da razão molar entre os reagentes; os tipos de catalisadores possíveis; o efeito do tempo de reação; o efeito da temperatura que varia em função dos tipos de óleos, gorduras e dos catalisadores (SANTIN, 2013).

3.4.1.1 Catálise química ácida

Esse tipo de catálise geralmente é utilizado quando o óleo possui alto teor de AGL e água (COSTA, 2011). Dentre os ácidos mais utilizados na reação de transesterificação, tem-se o ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), ácido fosfórico (H_3PO_4) e ácidos orgânicos e sulfônicos (GAMBA, 2009).

Sobre o mecanismo de transesterificação catalisado por ácidos, inicialmente ocorre ativação da carbonila do triacilglicerol formando uma carbocátion, tornando apto ao ataque nucleofílico do álcool, sendo que após a adição do nucleófilo ocorre um prototropismo intermolecular permitindo a eliminação do grupo abandonador – diglicerídeo, promovendo a desprotonação da carbonila do novo éster formado (Figura 10) (COSTA, 2011; RAMOS, et al., 2011).

Figura 10 – Mecanismo de transesterificação catalisado por ácidos.



Apesar dos catalisadores ácidos promoverem altos rendimentos (acima de 90%) no processo de transesterificação em ésteres alquílicos, a reação é considerada lenta, geralmente requerendo uma alta razão molar álcool/óleo e altas temperaturas para atingir uma boa conversão (GAMBA, 2009; COSTA, 2011).

Na transesterificação com catalisadores ácidos a principal vantagem em relação aos catalisadores básicos é que a quantidade de AGL é irrelevante, possibilitando o uso de óleos com menor valor agregado, assim diminuindo os custos. Entretanto, requer mais energia devido às condições e variáveis do processo. Razões molares álcool/óleo em torno de 30:1, temperaturas próximas de ebulição do álcool e tempo mínimo de três horas são variáveis geralmente utilizadas para a completa cinética da reação (RAMOS et al., 2011).

Outro inconveniente na transesterificação em meio ácido são os resíduos do catalisador, pois estes podem acarretar problemas para os equipamentos e partes metálicas de motor causando corrosão. Para evitar esse problema é necessária a realização de diversas etapas de purificação, o que requer grande quantidade de água nesse processo (GAMBA, 2009).

3.4.1.2 Catálise química básica

O hidróxido de sódio e de potássio são os catalisadores básicos mais utilizados em processos industriais para a produção de biodiesel, pois proporcionam maior velocidade de reação do que a conversão de catalisadores ácidos para a transesterificação de triglicerídeos em

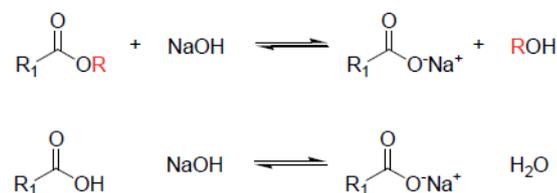
biodiesel (VILLADIEGO; ROA; BENÍTEZ, 2015). Catalisadores básicos são facilmente manipuláveis e menos corrosivos que os catalisadores ácidos, sendo que o rendimento na transesterificação é considerado elevado, na ordem de 90% (COSTA, 2011).

Exigem menores razões molares entre o álcool e o óleo vegetal, culminando assim em altas conversões (acima de 90%), e com isso, o processo de transesterificação é considerada aproximadamente 4000 vezes mais rápido quando comparado um catalisador ácido com a mesma quantidade, além de serem considerados menos corrosivos. Estas características justificam o porquê da utilização dos catalisadores básicos tradicionais em larga escala na indústria de produção do biodiesel (GAMBA, 2009).

Operacionalmente, as faixas de temperatura em que as reações de transesterificação via álcalis geralmente ocorrem é de 25 a 120°C. Neste processo, para que não ocorram problemas operacionais, o óleo deve apresentar baixa acidez (<0,5%) e tanto o álcool quanto o óleo devem ser isentos de água (GAMBA, 2009).

Alguns infortúnios são apresentados nesse tipo de processo, um deles é a produção de sabão obtido pela saponificação dos glicerídeos e/ou dos ésteres monoalquílicos formados, como também pela neutralização dos ácidos graxos livres (Figura 11) (COSTA, 2011). O óleo, principalmente o que apresenta altos teores de ácidos graxos livres, ocasiona o consumo improdutivo de álcalis e assim forma os sabões aumentando a viscosidade, formando emulsões e gel, dificultando a separação dos produtos (ésteres e glicerol) ao final da reação. O sabão é formado exatamente quando a reação dos hidróxidos com o álcool leva à formação de água que promove a formação de AGL podendo desativar o catalisador básico levando à hidrólise de algum éster produzido (GAMBA, 2009).

Figura 11 – Reações secundárias que podem ocorrer durante a transesterificação de óleos vegetais.



Fonte: COSTA, 2011.

As reações secundárias consomem parte do catalisador dificultando a separação do glicerol e purificação do biodiesel, além de diminuir o rendimento da transesterificação. Uma alternativa para corrigir esse problema é utilizar o catalisador alcalino em excesso na reação para depois remover com água, porém, tal estratégia eleva o custo de separação do produto (COSTA, 2011).

3.4.1.3 Catálise enzimática

Nesse tipo de catálise, enzimas livres ou imobilizadas são utilizadas no processo de transesterificação. É caracterizada por requerer menos energia no processo, pois as temperaturas de operação geralmente são brandas, além de apresentar maior facilidade de purificação dos ésteres produzidos e separação do glicerol gerado como subproduto no final da reação (SANTIN, 2013). Embora os processos que utilizam enzimas sejam caros, a produção de biodiesel por catálise enzimática é considerada ecologicamente mais viável e com rendimentos compatíveis (70-90%) quando comparados às catálises por rotas químicas. Reduzem os custos de energia no processo, bem como tendem a ter menores custos de tratamento de resíduos (RODRÍGUEZ et al., 2014; RAMOS et al., 2011).

Quando adicionadas na forma livre no reagente, sua atividade catalítica é diminuída quando em contato direto com o álcool dificultando a sua recuperação no final do processo. A fim evitar esse inconveniente, as enzimas são imobilizadas em suportes específicos onde as lipases, aderindo ou ficando confinadas as partículas sólidas, mantendo assim sua atividade catalítica favorecendo o seu reaproveitamento. Os principais suportes de imobilização utilizados são: filossilicato sol-gel, suportes de polipropileno, celite, resinas de troca iônica e espumas de poliuretano reticulado (GONZÁLEZ; GALLEGO; CASTAÑEDA, 2010).

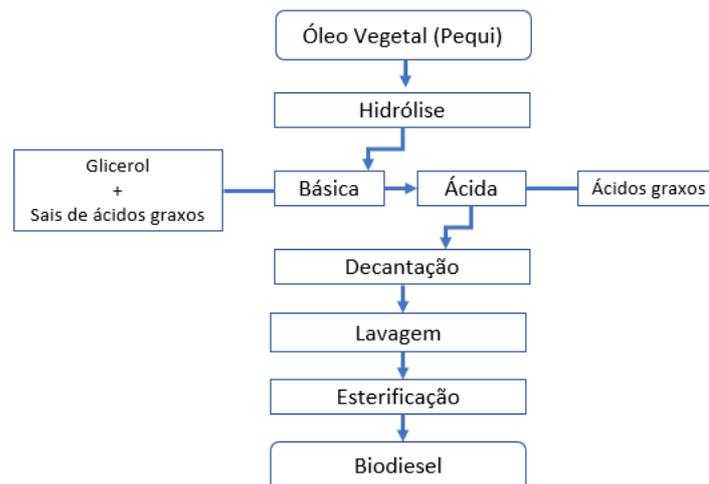
Com relação aos tipos de álcoois utilizados no processo de síntese de biodiesel, os mais comuns são: etanol e metanol, sendo este último o mais utilizado devido à fácil separação do produto, maior taxa de reação e maior rendimento de biodiesel, entretanto, a enzima pode ser inativada se este for adicionado no processo de forma integral. Uma alternativa ao uso do metanol é a utilização do etanol por ser menos agressivo às lipases, menos reativo, além de ser menos tóxico, devido ser uma fonte renovável, o que confere ao seu uso característica de sustentabilidade (MIRANDA, 2020).

Outro fator primordial a ser considerado nas reações de produção de biodiesel por rota enzimática é o teor de água. Isto porque a água possui papel fundamental da manutenção da estrutura tridimensional da enzima, sendo responsável pela área interfacial de atuação das enzimas, principalmente quando na forma solúvel. Altos teores de água obtidas da matéria-prima e da gerada a partir da esterificação de ácido graxo e álcool ocasiona hidrólise acarretando na diminuição da taxa de reação e no rendimento de produção. Já com baixos teores de água ocorre o aumento da concentração do álcool na fase aquosa podendo inativar o catalisador enzimático. Neste caso, um aumento na agitação da mistura se faz necessário a fim de atingir uma determinada área interfacial (MIRANDA, 2020).

3.4.2 Hidroesterificação

Em escala industrial, a tecnologia mais empregada para a produção de biodiesel é a transesterificação alcalina homogênea, principalmente porque este tipo de processo geralmente alcança elevados rendimentos de ésteres (até 99%) em um tempo geralmente baixo. Entretanto, alguns inconvenientes do processo são observados, sendo: necessidade de matéria-prima refinada com baixo teor AGL se teor de água a fim de evitar a formação de sabão como subproduto da reação, além da dificuldade de separação do catalisador e produção de água residual. Diante destes inconvenientes, surge uma alternativa tecnológica bastante promissora para a produção de biodiesel denominada de hidroesterificação (Figura 12) (MELLO; FILHO; SILVA, 2020).

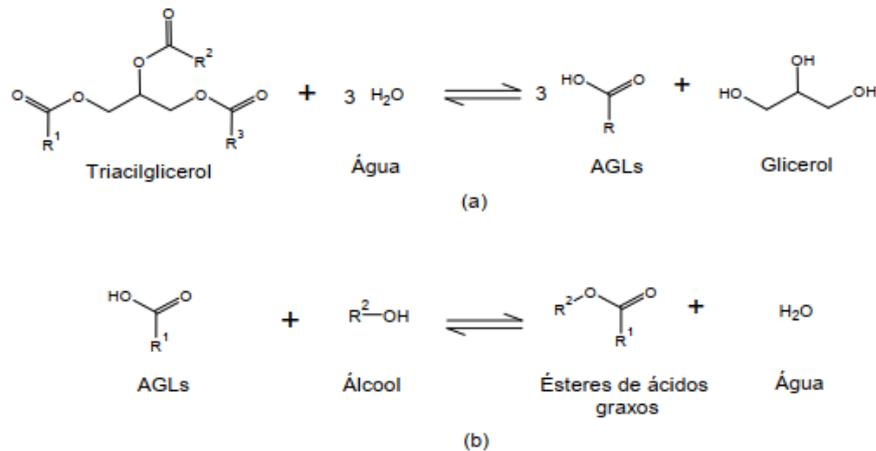
Figura 12 – Esquema do processo de hidroesterificação.



Fonte: PONTE, 2017 (adaptado).

A hidroesterificação é um processo realizado em duas etapas, sendo a primeira a hidrólise dos tri, di e monoacilgliceróis contidos nos óleos de origem vegetal e animal produzindo ácidos graxos e glicerol de alta qualidade; e a segunda, esterificação dos ácidos graxos formados na primeira etapa com um álcool de cadeia curta, podendo ser um metanol ou etanol gerando ésteres de ácidos graxos e água (Figura 13). Este processo favorece a utilização de matérias-primas de qualquer teor de ácidos graxos e umidade, uma vez que todos os triacilglicerídeos presentes no óleo serão transformados em ácidos graxos pelo processo de hidrólise. Sabendo que cerca 80% do custo de produção do biodiesel é justificado pelo custo da matéria prima, a hidroesterificação pode se tornar um interessante e importante processo com viabilidade técnico-econômica para produção do biodiesel (LAGE et. al., 2019; GOMES, 2009; MELLO; FILHO; SILVA, 2020).

Figura 13 – Reação de Hidroesterificação – (a) Hidrólise do triacilglicerol. (b) Esterificação de ácidos graxos livres.



Fonte: FILHO; SILVA, 2020.

Tanto na etapa de hidrólise quanto na de esterificação no processo de hidroesterificação para a produção de biodiesel, podem ser utilizadas as seguintes formas de catálise: catálise homogênea, heterogênea, enzimática e sem catalisador, com condições reacionais sub- ou super-críticas (SANTOS et. al., 2015).

Segundo Mello, Filho e Silva (2020), o uso de catalisadores homogêneos possui um menor custo de produção quando comparado com os catalisadores heterogêneos ou enzimáticos. Entretanto, estes primeiros necessitam de maiores tempos de reação e podem degradar os ácidos graxos pela adição de catalisador em excesso.

Para Santos et. al. (2015), a hidrólise ácida favorece consideravelmente a conversão de triacilglicerídeos em ácidos graxos livres, que quando esterificados para a formação de ésteres, podem chegar a 99% de conversão, obtendo água como subproduto que pode ser reaproveitada no processo.

No contexto geral do processo de hidroesterificação utilizando a catálise enzimática heterogênea, Mello, Filho e Silva (2020) relatam que esta rota elimina os problemas causados pelos catalisadores homogêneos convencionais, pois as enzimas utilizadas apresentam facilidade de separação do catalisador do meio reacional podendo, inclusive, reutilizá-las por diversas vezes, apresentando pouca ou nenhuma geração de efluentes e subprodutos, gerando produtos de elevada pureza através da utilização de temperaturas brandas prevenindo a degradação do produto de interesse, reduzindo assim, custos com energia, tornando-se uma prática ambientalmente correta.

Com relação à catálise enzimática utilizada da etapa de hidrólise, Santos et. al. (2015) afirmam que esta proporciona elevadas conversões de triacilglicerídeos em ácidos graxos; entretanto, esse tipo de reação requer controle rígido de pH e tempo de reações prolongadas.

A principal vantagem da utilização da hidroesterificação para produção de biodiesel em relação à transesterificação, é que nesse processo são aceitas matérias-primas diversas com baixo custo agregado sem necessidade de pré-tratamento, sendo os óleos brutos de origem vegetal e animal alternativas para a produção de biodiesel em detrimento aos óleos refinados. Neste processo o teor de ácido graxo livre não é relevante para a especificação da matéria-prima a ser utilizada (SANTOS et. al., 2015). As principais vantagens da hidroesterificação em relação à transesterificação podem ser observadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Comparativo do processo de hidroesterificação x transesterificação.

HIDROESTERIFICAÇÃO	TRANSESTERIFICAÇÃO
Uso de qualquer tipo de matéria prima graxa, com qualquer acidez e umidade (custo mais baixo)	Uso de matérias primas somente refinada, com acidez (0,1 mg NaOH/g, máx.) e umidade (0,1 % v/v, máx.) definidas, elevando o custo.
Na esterificação apenas água é gerada como subproduto, sendo ainda totalmente reaproveitada	Gera sabões, o que afeta o rendimento da produção e dificulta a separação biodiesel/glicerina
Maior pureza do biodiesel obtido, sem a necessidade de lavagem, requerendo apenas secagem	O biodiesel contém contaminantes (sabões) e requer sua purificação (etapa de lavagem com centrífuga)
Alta pureza da glicerina obtida, com baixo custo de purificação. Glicerina considerada de grau alimentício.	Glicerina contém contaminantes (sabão, sal, álcool, resíduos graxos) difíceis de separar, com alto custo de processo (não pode ser considerada grau alimentício)
Não requer tratamento de efluentes, pois não tem resíduos líquidos e sólidos	Requer tratamento de efluentes

Fonte: SANTOS et. al., 2015 (adaptado).

3.4.2.1 Hidrólise

A hidrólise pode ser entendida como uma reação química que ocorre entre um triacilglicerídeos de um óleo de origem animal e vegetal com água, podendo ocorrer na presença de catalisadores ácidos ou básicos, produzindo ácidos graxos como produto de interesse principal e o glicerol como subproduto sendo caracterizada por um aumento gradual na velocidade da reação, devido ao aumento da solubilidade da água nos acilglicerídeos (mono- e di-), sendo que os principais fatores que afetam esta reação são: tipos de catalisadores, temperatura, teor de

água no meio reacional e concentração de glicerol liberado na fase aquosa (GOMES, 2009; SANTOS, 2016).

Segundo Aranda (2014), existe uma viabilidade considerável no uso da hidrólise através do catalisador ácido, uma vez que favorece a transformação completa dos triacilglicerídeos em AGL que podem ser esterificados para formar ésteres, principalmente com matérias-primas como óleos de frituras, gorduras advindas da indústria, óleos de plantas oleaginosas e borras ácidas de refino de óleos de origem vegetal.

3.4.2.2 Esterificação

A esterificação consiste na formação de ésteres alquílicos a partir da reação entre um ácido graxo e um álcool de cadeia curta podendo ser o etanol ou metanol, geralmente em altas temperaturas, obtendo também, água como subproduto. A reação de esterificação pode ser tanto catalisada por ácidos fortes, sendo o ácido sulfúrico o mais comumente utilizado, como também por catalisadores enzimáticos (SANTOS et al., 2015; SANTOS, 2011).

A catálise ácida na reação de esterificação pode ser utilizada diretamente na produção de biodiesel, principalmente por meio de óleos e gorduras não refinados e de baixa qualidade gerando altas conversões (acima de 90%) de ácidos graxos em ésteres e velocidade de reação quando comparado com o processo de transesterificação, visto que neste último ocorre em três etapas reacionais com formação de intermediários, sendo que na esterificação ocorre apenas em uma única etapa (SANTOS et al., 2015).

A razão molar álcool: óleo, a quantidade de catalisador e a temperatura de reação são as principais variáveis que podem interferir na taxa e eficiência da conversão de ácidos graxos em ésteres numa reação de esterificação (SANTOS, 2011).

3.4.2.3 Ácidos graxos

Óleos vegetais e gorduras animais são os lipídios geralmente encontrados na natureza que apresentam estruturas relacionadas, sendo essencialmente compostos por uma mistura de triglicerídeos contendo uma variedade de ácidos graxos que podem diferir no comprimento da cadeia e no grau de saturação (SOUZA, 2019).

No geral, os óleos vegetais possuem maior proporção de triglicerídeos com ácidos graxos insaturados e pontos de fusão mais baixos, isso porque as ligações duplas C=C introduzem curvaturas e torções nas cadeias de hidrocarbonetos, tornando a formação de cristais mais difícil. Com isso, quanto mais ligações duplas existem na cadeia, mais dificuldades as moléculas terão de se cristalizarem, e menor é o ponto de fusão desse tipo de óleo, o que justifica serem líquidos à temperatura ambiente (SOUZA, 2019).

Já com relação as gorduras, na sua grande maioria, são de origem animal e são formadas por triglicerídeos que contêm ácidos graxos saturados ou monoinsaturados, onde estas cadeias saturadas possuem uma forma uniforme que possibilita empacotamento mais eficiente em uma rede cristalina, fazendo com que os triglicerídeos apresentem pontos de fusão relativamente elevados, o que justifica uma característica de solidez as gorduras na temperatura ambiente (SOUZA, 2019).

Ácidos graxos são compostos de ácidos carboxílicos de cadeias longas contendo hidrogênio e carbono, sendo este último variando de 4 a 36 carbonos. Entretanto, os ácidos graxos de ocorrência mais comum em óleos vegetais e gordura animal apresentam número par de átomos de carbono, de 12 a 24, em uma cadeia não ramificada (Tabela 2). Os ácidos graxos saturados mais encontrados são os ácidos palmítico (C16) e os ácidos esteárico (C18); já insaturados, são os ácidos oleico e linoleico (ambos C18) (SOUZA, 2019).

Tabela 2 – Estrutura, nomenclatura, nome sistemático e fórmula molecular dos principais ácidos graxos de ocorrência natural.

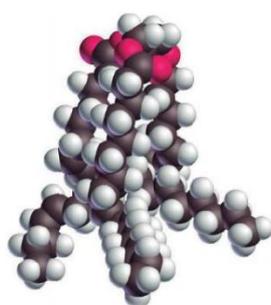
ESTRUTURA	NOME COMUM	NOME SISTEMÁTICO	FÓRMULA MOLECULAR
12:0	Láurico	Dodecanóico	$C_{12}H_{24}O_2$
14:0	Mirístico	Tetradecanóico	$C_{14}H_{28}O_2$
16:0	Palmítico	Hexadecanóico	$C_{16}H_{32}O_2$
16:1	Palmitoleico	9Z-Hexadecenóico	$C_{16}H_{30}O_2$
18:0	Esteárico	Octadecanóico	$C_{18}H_{36}O_2$
18:1	Oleico	9Z-Octadecenóico	$C_{18}H_{34}O_2$
18:2	Linoleico	9Z,12Z Octadecadienóico	$C_{18}H_{32}O_2$
18:3	Linolênico	9Z,12Z,15Z Octadecatrienóico	$C_{18}H_{30}O_2$
20:0	Araquídico	Eicosanóico	$C_{20}H_{40}O_2$
22:0	Behênico	Docosanóico	$C_{22}H_{44}O_2$
22:1	Erúcico	13Z-Docosenóico	$C_{22}H_{42}O_2$
24:0	Lignocérico	Tetracosanóico	$C_{24}H_{48}O_2$

Fonte: SOUZA, 2019 (adaptado).

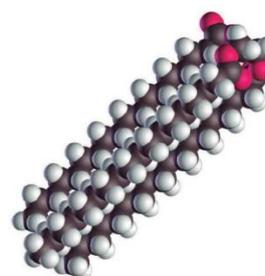
Segundo Souza (2019), devido à livre rotação em torno de cada ligação carbono-carbono, as cadeias de carbono de ácidos graxos saturados podem adotar várias conformações, entretanto a mais estável é a totalmente estendida, pela qual o impedimento estérico dos átomos vizinhos é minimizado. Agrupam-se de forma compacta, em arranjos quase cristalinos.

A Figura 14 apresenta um exemplo genérico de empacotamento a nível molecular dos óleos e gorduras.

Figura 14 – Simulação da estrutura molecular de um óleo e de uma gordura.



Moléculas de um óleo



Moléculas de uma gordura

Fonte: BRUICE, 2006 (adaptado).

3.5 Enzimas

As enzimas são proteínas formadas por subunidades de aminoácidos combinadas por ligações peptídicas, que possuem entre 62 e 2500 resíduos de aminoácidos e são consideradas catalisadores sustentáveis. Estes resíduos formam entre si ligações do tipo covalentes entre grupos carboxílicos e aminas gerando grandes cadeias polipeptídicas de estruturas complexas. São biocompatíveis, biodegradáveis e são derivados de recursos renováveis. O número de enzimas disponíveis comercialmente e a gama de aplicações estão aumentando gradualmente. Desde a antiguidade que as enzimas são conhecidas e exploradas, sendo atualmente utilizadas em vários segmentos das indústrias, como alimentos, laticínios, produtos farmacêuticos, detergentes, têxteis, papel e celulose, ração animal, couro e cosméticos (SOUZA, 2013; HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

Segundo Silva et al. (2020), estima-se que no mercado mundial de enzimas obtenha no período de 2019 a 2026 uma taxa de crescimento anual por volta de 6,75%, passando de U\$ 8,8 bilhões em 2018 para U\$ 13,79 bilhões até 2026. Este aumento de em torno de 68% no referido período é atribuído ao uso das enzimas em diversos setores da indústria, tais como, processamento de alimentos, papel, biocombustíveis, detergentes biológicos, setores de biologia molecular, entre outros.

Considerando a principal reação catalisada, as enzimas são classificadas em seis classes, cada uma com subclasses, com base nos tipos de reações que catalisam, a saber: oxidorreduções, transferências, hidrolases, liases, isomerases e ligases (VESCOVI, 2012).

Existem muitas razões para o crescente interesse na utilização de enzimas em reações químicas em comparação com processos de sínteses orgânicas convencionais, dentre elas podemos citar: alto grau de especificidade, condições de reação moderadas, normalmente à temperatura ambiente e em pH próximo da neutralidade, diminuição nas reações colaterais e simplicidade de recuperação. Além disso, os processos químicos utilizando enzimas consomem menos energia e, conseqüentemente, reduzem a extensão da degradação térmica e geram menos resíduos. Em suma, os processos enzimáticos são mais ecológicos, mais econômicos e mais sustentáveis. Conseqüentemente, nas últimas duas décadas, a biocatálise surgiu como uma tecnologia importante para atender à crescente demanda por fabricação de produtos químicos verdes e sustentáveis (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004; SHELDON; PELT, 2013; SOUZA, 2013).

Souza (2013) relata que é através da interação da enzima-substrato que se atribui a função catalítica da enzima devido à realização de orientação favorável na formação deste

complexo. O substrato liga-se à região ativa da enzima e parte da sua especificidade catalítica depende também da natureza das ligações envolvidas. Essas ligações dependem do arranjo precisamente definido dos átomos no sítio ativo.

Dentre todas as enzimas, as lipases estão ganhando cada vez mais importância, sendo utilizadas na maioria das áreas tecnológicas que envolvam aplicações com enzimas, principalmente devido às suas propriedades em termos de enantiosseletividade, regioseletividade e ampla especificidade de substrato (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

3.5.1 Lipases

As lipases são enzimas que catalisam naturalmente a hidrólise de cadeias longas de triglicerídeos insolúveis em meio aquoso (diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol) e outras formas de ésteres insolúveis de ácidos graxos. Essas propriedades permitem que elas sejam empregadas em diferentes reações bioquímicas, incluindo esterificação, transesterificação, interesterificação, acidólise, aminólise, alcoólise e acilação. Podem ser encontradas na natureza em diversos microrganismos como bactérias, fungos e nas leveduras. Geralmente são estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente e a maioria apresenta sua atividade ótima na faixa de temperatura de 30 a 40°C. O potencial de aplicação das lipases é aparente na produção de biocombustíveis, compostos orgânicos sintéticos, detergentes, perfumes, cosméticos, couro, produtos farmacêuticos, diagnósticos médicos e alimentos. A seleção de lipase para cada uma dessas aplicações baseia-se na sua especificidade e estabilidade em diferentes sistemas de solventes. Além disso, as lipases aceitam uma grande variedade de substratos, mantendo sua regioseletividade e estereosseletividade. Para fins industriais, há um interesse maior pelas enzimas microbianas, devido a sua facilidade de produção em larga escala (FAN; QIAN, 2010; SALIHU; ALAN, 2015; BÔA MORTE, 2017; BASTIANELLO, 2011; SOUZA, 2013).

As lipases são consideradas enzimas versáteis principalmente por causa de sua seletividade, condições de reação moderadas, capacidade de utilizar ampla gama de substratos, alta estabilidade em relação à temperatura e pH extremos (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

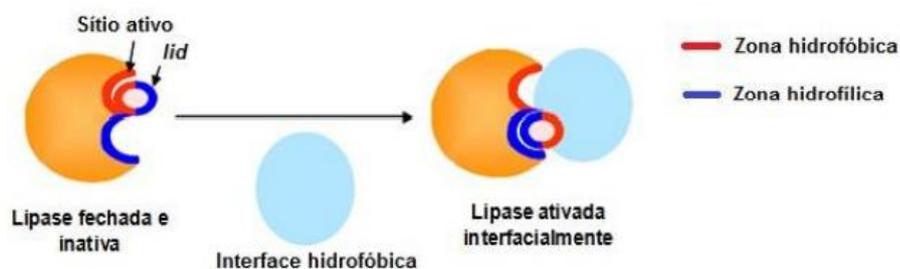
De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), as lipases são classificadas como triacilglicerol hidrolases que, segundo a EC (Enzyme Commission), possuem a seguinte atribuição de quatro dígitos: EC 3.1.1.3, sendo que o primeiro dígito (3) refere-se ao nome da classe de enzima (hidrolase); o segundo dígito (1) refere-se à subclasse de atuação sobre ligações éster; o terceiro dígito (1) refere-se à sub-

subclasse (carboxil éster hidrolase); e o quarto dígito (3) é o número de série dentro da subclasse e significa que a enzima atua sobre triacilglicerídeos (VESCOVI, 2012). Como hidrolases, as lipases não requerem cofatores (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

As principais características das estruturas ativas das lipases incluem uma β -dobrada (central, hidrofóbica, β -folha que é coberta por uma hélice de ambos os lados), um sítio ativo formado pela tríade serina, histidina e ácido aspártico, um orifício de oxianion e, na maioria dos casos, uma tampa formada por uma hélice que cobre o sítio ativo (BANSODE; RATHOD, 2017).

Há basicamente dois tipos de configuração em relação ao mecanismo de reação das lipases, também conhecido como ativação interfacial, uma denominada de “fechada”, sendo inativa, na qual o contato entre o sítio ativo e o meio reacional é protegido por uma cadeia polipeptídica hidrofóbica denominada de tampa (lid); já a outra configuração, conhecida comumente como “aberta”, ocorre quando essa tampa é deslocada devido mudança conformacional quando na presença de suporte com superfície hidrofóbica, e com isso, o substrato, onde está o sítio ativo, é totalmente exposto ao meio reacional. Este sítio geralmente é caracterizado por uma tríade composta dos aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico, sendo intermediários essenciais em todas as reações catalisadas por lipases. Com isso, a região aberta da enzima (sítio ativo) interage com o suporte por adsorção hidrofóbica ocorrendo sua imobilização (Figura 15) (SOUZA, et al., 2017; VESCOVI, 2012; ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

Figura 15 – Mecanismo de ativação interfacial de lipases em interfaces hidrofóbicas



Fonte: RODRIGUES, 2009.

Grande parte das lipases regioseletivas atua preferencialmente nas ligações éster na posição sn-1 e sn-3 da estrutura do triglicerídeo, enquanto poucas lipases são ativas na posição sn-2 (HOUDE; KADEMI; LEBLANC, 2004).

As lipases que apresentam alta atividade em meio aquoso tendem a ter atividades mais baixas numa ordem de magnitude de até quatro ou cinco vezes em meio não aquoso. Vários fatores podem contribuir para esse efeito, incluindo interrupção da estrutura terciária devido a

mudanças no meio hidrofóbico, flexibilidade conformacional limitada, dessolvatação do sítio ativo, resultando em ligação enzima-substrato limitada e desnaturação interfacial da enzima devido à tensão interfacial (SALIHU; ALAN, 2015). É importante verificar o grau de quantidade de água residual quando da utilização de lipases em meios não aquosos. Isso pode influenciar na atividade da enzima, termoestabilidade, bem como na estereosseletividade. Já com relação à enantioseletividade, geralmente aumenta com a diminuição da temperatura. (ANGAJALA; PAVAN; SUBASHINI, 2016).

Estima-se que as lipases em extratos líquidos possuem valores de atividade enzimática de 30 a 40 vezes mais baixos em relação às enzimas imobilizadas podendo tornar o processo mais competitivo em relação aos processos convencionais. Entretanto o uso de enzimas livres apresentam algumas desvantagens, sendo: dificuldade no processo de reuso, sensibilidade ao calor e pH, sendo que tais desvantagens podem ser mitigadas ou até eliminadas com o uso de suportes para imobilização das enzimas (REMONATTO, 2017).

As lipases são mais utilizadas devido à sua especificidade por substrato, além de apresentar uma elevada enantioseletividade. Estas propriedades tornaram as lipases as enzimas com maior uso em biocatalisador (SANTOS, 2011). No processo de produção de biodiesel, as lipases mais utilizadas são: *Candida Antarctica*, *Rhizomucor miehei*, *Pseudomonas cepacia* e *Rhizopus orizae* (GONZÁLEZ; GALLEGO; CASTAÑEDA, 2010).

3.5.1.1 *Candida antarctica* (CALB)

Devido suas características de alta enantioseletividade e região-seletividade quando comparadas a outras lipases, a enzima *Candida antarctica* (CALB) vem sendo bastante estudada (SANTOS, 2011; VESCOVI, 2016). A CALB pertence à família das α/β hidrolases e possui uma tríade catalítica clássica composta de Ser, His, Asp/Glu, tendo o mesmo comportamento de mecanismo reacional de outras lipases (SOUZA, 2013). É composta por 317 resíduos de aminoácidos (Tabela 3) e apresenta uma massa molecular de 33 kDa e pI de 6,0 com estrutura do tipo globular (30 Å X 40 Å X 50 Å) (VESCOVI, 2016). Nesta enzima, a abertura de ligação para o substrato, ou seja, para o sítio ativo, consiste em uma cavidade para ligações acila e outra parte para ligações com álcoois. De encontro com a maioria das lipases, que geralmente apresentam um tampa com impedimento maior na entrada do sítio ativo, na CALB essa tampa é menor, o que não prejudica a entrada de substratos e saída de produto (SOUZA, 2013).

Tabela 3 – Composição de aminoácidos da CALB.

Aminoácidos	Unidades	Percentual (% unidades)
Ala	36	11,36
Arg	8	2,52
Asn	14	4,42
Asp	14	4,42
Cys	6	1,89
Gln	18	5,68
Glu	4	1,26
Gly	26	8,20
His	1	0,32
Ile	11	3,47
Leu	31	9,78
Lys	9	2,84
Met	4	1,26
Phe	10	3,15
Pro	30	9,46
Ser	31	9,78
Thr	27	8,52
Trp	5	1,58
Tyr	9	2,84
Val	23	7,26

Fonte: VESCOVI, 2016 (adaptado).

A CALB apresenta comportamento estável em meio aquoso na faixa de pH de 3,5 a 9,5, entretanto, o pH de 7,0 é o ponto considerado ótimo (VESCOVI, 2016). Já com relação à temperatura, a CALB na forma solúvel é considerada instável; entretanto, quando imobilizada, apresenta elevada estabilidade, o que confere a viabilidade de sua utilização em processos químicos em altas temperaturas por longos tempos sem perdas importantes de sua atividade (SANTOS, 2011).

A *Candida antarctica* B (CALB) apresenta alta estereoespecificidade quanto a substratos quirais em hidrólises e sínteses orgânicas, além de alta estabilidade térmica na presença de solventes orgânicos. Entretanto, esta enzima não é tão eficiente em hidrólise de triglicerídeos quando comparada a maioria das lipases (VESCOVI, 2016).

3.5.1.2 Eversa® Transform 2.0

Devido o aumento da demanda do biodiesel nos últimos anos, muitas empresas vêm buscando lipases mais baratas. Diante disso, a empresa Novozymes S/A (Dinamarca) lançou uma formulação líquida de lipase de *Thermomyces lanuginosus* sob o nome comercial Callera™ Trans. Em dezembro de 2014, a Novozymes S/A (Dinamarca) lançou a lipase Eversa® Transform para produção de biodiesel enzimático em escala industrial. Conseqüentemente, uma nova formulação, com maior estabilidade, foi apresentada após maio

de 2016, denominada de Eversa® Transform 2.0 (MONTEIRO et al., 2020; NOVOZYMES, 2017).

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* é produzida por uma cepa geneticamente modificada de *Aspergillus oryzae* com alta especificidade e atividade em condições brandas de processo, sendo uma enzima monomérica com 269 resíduos de aminoácidos, dos quais quatro são resíduos de Trp (triptofano) 89, 117, 221 e 260 apresentando massa molar de aproximadamente 30 kDa, com uma monoglicólise em Asn33 (asparagina), adicionando aproximadamente 2 kDa à massa molar final da enzima (PINHOLT et al., 2010; FRAGA et al., 2019).

Embora a Eversa® Transform 2.0 tenha sido produzida para ser utilizada principalmente em sua forma livre, conforme recomendado pelo fornecedor, uma imobilização adequada pode melhorar muitas propriedades, como estabilidade, atividade, seletividade ou especificidade, resistência a inibidores ou produtos químicos, e também aplicações como biocatalisador em outras reações. Sua resistência e estabilidade estão muito acima da média em termos de temperatura, solvente e pH. Assim, este biocatalisador pode apresentar desempenho interessante em outros sistemas, desde que adaptado para tal finalidade. Portanto, a possibilidade de imobilização de enzimas em suportes hidrofóbicos permite o uso de Eversa® Transform 2.0 para esterificação em sistemas anidros é favorável devido ao rearranjo em sua estrutura molecular, que permite que sua forma ativa seja estabilizada (FACIN et al., 2021).

3.5.2 Imobilização de enzimas

Trata-se do confinamento físico e químico das enzimas em um determinado local, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação, com retenção de sua atividade catalítica, tornando possível a sua reutilização (BÔA MORTE, 2017). Como forma de otimizar o processo de transesterificação e esterificação para produção de biodiesel, a técnica de imobilização de enzimas pode ser aplicada no intuito de reutilizá-las, mantendo a atividade catalítica e seletividade, sendo que após o término da reação, a enzima pode ser facilmente separada do biodiesel e do glicerol através do processo de decantação. Isso se deve à retenção das suas atividades catalíticas e devido ser insolúvel ao meio reacional (BASTIANELLO, 2011). Segundo Santos (2011), o uso de enzimas livres não é favorável devido à perda de suas propriedades específicas como a atividade catalítica e consequente inativação, entretanto, tal inconveniente pode ser resolvido através da imobilização da enzima em um suporte.

Existem dois tipos de leitos para a imobilização de enzimas: a primeira, onde estas são aprisionadas fisicamente encapsuladas em fibras, polissacarídeos ou de polímeros sintéticos; e o segundo, onde aderem à superfície com as células fixadas ao suporte diretamente por ligações químicas iônicas ou covalentes. De forma resumida, em um tipo, a enzima fica retida no interior da matriz de imobilização e no outro a enzima se encontra sobre a superfície do suporte (BÔA MORTE, 2017; RAMOS et al., 2011).

Ismail e Baek (2020) relatam que é necessário o estudo e o desenvolvimento de novos materiais para a produção de suportes para imobilização de enzimas que apresentem porosidade suficiente, área de superfície e equilíbrio hidrofóbico / hidrofílico que aumentem a quantidade de enzima que será catalisada no alvo da reação, buscando sempre propriedades específicas, incluindo estabilidade térmica e química, inércia, maior reutilização, heterogeneidade, boa afinidade para enzima (lipase), presença de grupos funcionais interativos, força física, disponibilidade, e baixo custo. Além disso, o suporte deve melhorar e facilitar a fixação de locais ativos de lipase às moléculas de substrato e deve ter uma morfologia distinta para minimizar as limitações de difusão.

As enzimas imobilizadas possuem algumas vantagens em relação às solúveis, sendo: os produtos são facilmente separados do meio reacional; maior vida útil da enzima imobilizada permitindo redução de custo; atividade e estabilidade podem ser aumentadas; processo facilmente controlado; uso de maior dosagem por volume de reator. Entretanto, como desvantagem, o processo pode tornar-se caro dependendo da relação entre o custo do suporte e a estabilidade do derivado imobilizado (BÔA MORTE, 2017; SOUZA, L. T. de A. et al., 2017).

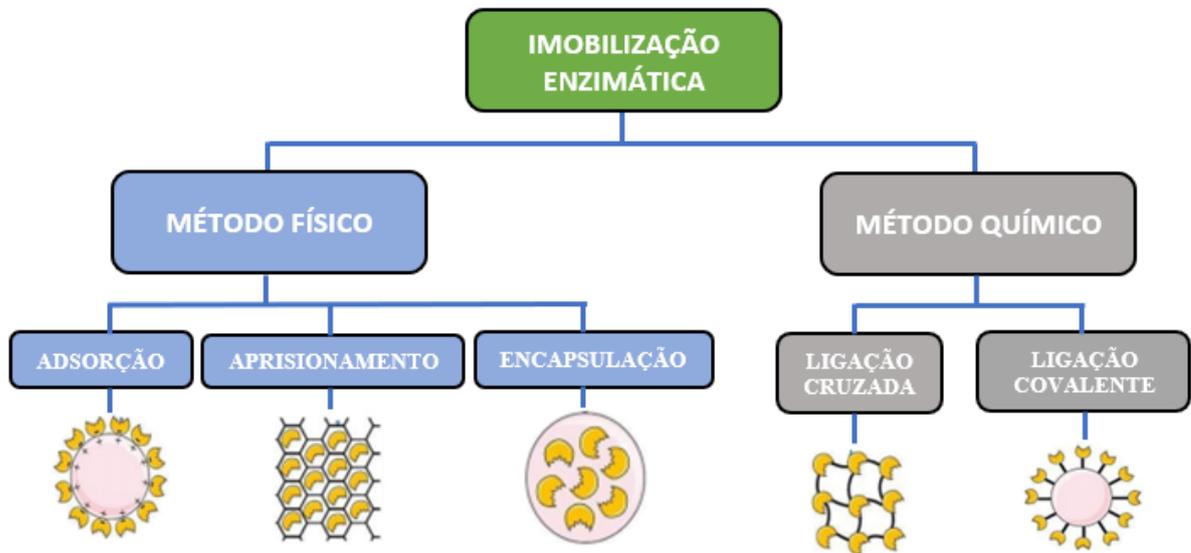
Os termos mais utilizados para determinar o sucesso da imobilização da enzima no suporte são o rendimento da imobilização, a eficiência da imobilização e a recuperação da atividade. O rendimento da imobilização deve ser usado para descrever a porcentagem da atividade enzimática total da solução de enzima livre que é imobilizada (SHELDON; PELT, 2013):

$$\text{Rendimento (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Atividade imobilizada}}{\text{Atividade inicial}} \right) \quad (1)$$

A atividade imobilizada só pode ser obtida corretamente medindo a atividade enzimática residual total que permanece na solução de enzima após a imobilização e subtraindo essa atividade da atividade inicial total. É fundamental um experimento em branco para compensar a desativação da enzima livre nas condições de imobilização (SHELDON; PELT, 2013).

Existem diferentes técnicas para imobilização de enzimas que são categorizadas em dois métodos: químicos e físicos (Figura 16). Nos métodos físicos, a enzima pode se ligar por adsorção, formando ligações mais fracas com o suporte de imobilização, sendo as mais comuns: forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, ligação iônica, ligações de hidrogênio e ligação por afinidade, podendo ser encapsuladas ou aprisionadas. Já nos métodos químicos ocorrem a formação de ligações covalentes obtidas pela ligação de éter, tioéter, amida ou carbamato entre a enzima e o suporte, como também, através de ligações cruzadas entre a enzima e um agente reticulante (SILVA et. al., 2020).

Figura 16 – Técnicas de imobilização de enzimas.



Fonte: SILVA et. al., 2020 (adaptado).

As lipases podem ser imobilizadas pelo método físico de adsorção através de suportes hidrofóbicos devido sua característica peculiar de adsorção interfacial. Deste modo, a atividade das lipases aumenta devido a tampa encontrar-se aberta, o que facilita a entrada do substrato ao sítio ativo da enzima. Em contrapartida, as interações com o suporte são relativamente fracas e a enzima pode lixiviar devido a mudanças de temperatura, polaridade do solvente, força iônica e pH fazendo com que o catalisador seja utilizado somente em condições específicas (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; MIRANDA, 2020).

No intuito de evitar a lixiviação das enzimas para o meio reacional, métodos químicos de imobilização através de ligações covalentes são utilizados, pois promovem uma ligação estável entre a enzima e o suporte podendo ser uni ou multipontual por meio de aminoácidos de cadeias laterais, como um grupo ϵ -amino (lisina), tiol (cisteína) e carboxílico (ácidos aspártico

e glutâmico) acarretando a estabilização da estrutura terciária da enzima imobilizada aumentando a estabilidade da atividade catalítica diante de altas temperaturas, pH extremos e na presença de solventes. Porém, um infortúnio deste método é o enrijecimento da estrutura da enzima, podendo ocasionar à perda de atividade e inativação (MIRANDA, 2020).

A seleção da técnica de imobilização é a etapa mais importante do processo de imobilização das lipases determinando essencialmente a eficiência, suas propriedades em uma reação catalítica específica, que incluem a atividade geral, eficácia de utilização, características de reutilização e inativação, toxicidade dos reagentes de imobilização e custo do procedimento de imobilização. Com isso, existem quatro métodos principais para imobilização de lipases: adsorção física, aprisionamento ou encapsulamento, ligação covalente e cruzada (ISMAIL; BAEK, 2020).

Nesta perspectiva, a utilização do uso de nanopartículas magnéticas como suporte sólido para biocatalisadores vem ganhando cada vez mais o interesse de pesquisadores devido apresentarem requisitos fundamentais para a produção de biodiesel para rotas enzimáticas, sendo: fácil recuperação por simples aplicação de um campo magnético externo, reduzindo os custos de energia e tempo das etapas de centrifugação. Além de apresentam uma alta relação superfície/volume facilitando assim a transferência de massa (SILVA et al., 2020).

3.5.2.1 Imobilização de enzimas utilizando nanopartículas magnéticas

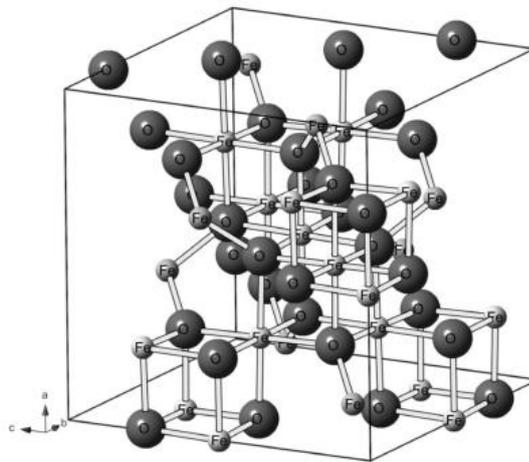
A recuperação do biocatalisador fora da reação após o processo biocatalítico é um problema crítico. Com isso, ligar as moléculas das enzimas em um suporte de nanopartículas magnéticas e separar a lipase imobilizada através do uso de um ímã ou campo magnético poderia resolver tal problema. Além da existência de inúmeros grupos hidroxila, nanopartículas magnéticas também são reconhecidos por apresentar uma área de superfície expandida, tornando-as facilmente modificáveis e robustas quando covalentemente ligadas à lipase. Existem outras características significativas, incluindo boa estabilidade mecânica, bem como baixa porosidade, que minimiza obstáculos estéricos permitindo a formação de uma enzima estável na matriz biocatalítica (ISMAIL; BAEK, 2020). Suas características são influenciadas pelo sua morfologia, estrutura cristalina e morfologia (SILVA et al., 2020).

Souza (2013) complementa que as características gerais das nanopartículas magnéticas, são: fortes interações com as enzimas, boa reatividade química, tolerância a maiores temperaturas e elevada área superficial faz com que este tipo de nanoestrutura seja considerada uma alternativa aos suportes enzimáticos convencionais.

Nanopartículas magnéticas podem ser manipulados por um campo externo. Possuem superfície hidrofílica com alta razão superfície/volume, geralmente apresentando estado superparamagnético (SILVA et al., 2020).

O material utilizado para a produção da nanopartícula magnética é o minério de ferro denominado magnetita (Fe_3O_4), que é um material ferrimagnético contendo ferro com estado de oxidação Fe^{2+} e Fe^{3+} e sua estrutura é do tipo espinélio inverso, onde os íons O^{2-} formam um arranjo cúbico denso de face centrada (CFC) e cátions do ferro ocupando sítios intersticiais tetraédricos e sítios octaédricos. Este arranjo acarreta uma estrutura de ferro bivalente e trivalente que a torna diferente de outros óxidos, apresentando uma célula unitária com oito íons Fe^{3+} localizados no sítio tetraédrico e no sítio octaédrico 8 íons Fe^{3+} e 8 íons Fe^{2+} (Figura 17). Com isso, devido à distribuição dos íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} na rede cristalina é que o torna um material com características magnéticas interessantes para aplicações em diversas áreas da indústria, saúde e meio ambiente (SOUZA, 2013; SILVA, 2017).

Figura 17 – Estrutura cristalina da magnetita.



Fonte: OLIVEIRA; FEBRIS; PEREIRA, 2013.

Existem diversos métodos para a produção de nanopartículas magnéticas sintéticas, dentre estes pode-se citar a moagem de altas energias, sol-gel, hidrotermal e co-precipitação. No entanto, o método de co-precipitação é um dos mais utilizados e de baixo custo, devido à sua simplicidade e eficiência química para a preparação de vários materiais sólidos (SOUZA, 2013; SILVA, 2017).

No processo de co-precipitação é possível se obter partículas com diâmetro na faixa 5 a 100 nm e baseia-se na preparação de uma mistura estequiométrica de sais de ferro dupla e triplamente ionizados, onde, posteriormente, uma base é acrescida à mistura, para que a mesma

fique com pH entre 8 e 14, e as partículas de magnetita possam ser precipitadas. Fatores como pH, força iônica, temperatura e natureza dos sais podem ser ajustáveis a fim de obter o controle do tamanho e da forma das nanopartículas (SILVA, 2017).

Entretanto, a magnetita por ser constituída por esses dois tipos de íons de ferro torna-se uma fase muito susceptível às condições ambientais, sofrendo com facilidade oxidação do Fe^{2+} para Fe^{3+} , o que leva a segregação de uma fase (metaestável) a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), e esta se transforma em hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) em temperaturas compreendidas entre 370°C e 600 °C. Os sítios octaédricos na estrutura da magnetita podem acomodar os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} e, por isso, o Fe^{2+} pode ser facilmente oxidado ocasionando perda das propriedades magnéticas (SILVA, 2017; OLIVEIRA; FEBRIS; PEREIRA, 2013).

Além do inconveniente de oxidação da magnetita, outras limitações são identificadas nas nanopartículas magnéticas, sendo: baixas estabilidade e dispersividade em determinados solventes, como por exemplo a água; tendência de se aglomerarem a fim de minimizar a energia livre superficial. Deste modo, faz-se necessário necessária a modificação da sua superfície proporcionando um recobrimento apropriado dessas partículas para mitigar estes inconvenientes e proporcionar maior eficiência de imobilização enzimática (SILVA et al, 2020).

Uma das formas de modificação de superfície das nanopartículas, pode-se citar o uso do aminopropiltriétoxissilano (APTES) gerando um revestimento de silicato podendo criar pontos de ligação dos grupos amins para diferentes moléculas evitando agregação das nanopartículas, estabilização das nanopartículas magnéticas contra oxidação e promover interação moleculares. Visando a utilização das nanopartículas magnéticas como suporte para a imobilização enzimática, utiliza-se um composto químico denominado glutaraldeído que atua como um dos principais agentes reticulantes aumentando as interações moleculares (SOUZA, 2013). Estas interações moleculares promovem a imobilização enzimática, que pode ser do tipo covalente devido a modificação da superfície das nanopartículas magnéticas por meio de reações de ativação, na qual grupos funcionais produzem intermediários reativos nos diversos resíduos da enzima, acarretando rigidez na sua estrutura, podendo mantê-la inalterada quando em contato com pH extremos, solventes orgânicos, altas temperaturas, entre outros agentes desnaturantes (SOUZA et al, 2017).

A capacidade de ligação e especificidade catalítica das enzimas são favorecidas devido a elevada área superficial em relação ao volume apresentada nas nanopartículas magnéticas de ferro. O seu campo magnético é responsável pela recuperação do complexo enzimático, impedindo a contaminação do produto final da enzima. Outro fator importante é que a utilização deste tipo de suporte enzimático potencializa a estabilidade enzimática devido a baixa

resistência de transferência de massa podendo, com isso, reduzir o custo operacional (SOUZA, 2013).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

A matéria-prima utilizada como fonte de triacilglicerídeos foi o óleo extraído da polpa de pequi de forma artesanal adquirido no Mercado Central de Teresina no estado do Piauí. O óleo obtido foi acondicionado em recipiente polimérico (garrafa PET), mantido em temperatura ambiente ao abrigo de luz até a execução das análises físico-químicas.

A lipase de *Candida antarctica* do tipo B foi comprada da Novozymes S/A (Dinamarca). A Lipase *Thermomyces lanuginosus*, conhecida comercialmente como Eversa® Transform 2.0, também foi adquirida da Novozymes S/A (Dinamarca). O (3-aminopropil) trietoxissilano (AP-TES), solução de glutaraldeído Grau II 25% (p/v), *p*-nitrophenilbutirato (*p*-NPB) e *p*-nitrofenol (*p*-NP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) foram produzidas pelo método de co-precipitação (BARRETO et al., 2012). Os reagentes químicos utilizados para esta produção foram $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (99%, granulado puro), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (99%, granulado puro) e 30% de solução de amônia. Todos os reagentes de grau analítico foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil) e da Vetec (São Paulo, Brasil).

4.2 Caracterização físico-química do óleo bruto de pequi

O óleo bruto de pequi foi avaliado quanto ao índice de acidez, ao teor de umidade, viscosidade cinemática à 40°C, massa específica à 20°C, além da determinação do perfil dos Ácidos Graxos (%) por Cromatografia Gasosa (CG/ FID). As análises do índice de acidez e da viscosimetria cinemática à 40 °C foram feitas em triplicatas; já o teor de umidade foi realizado em duplicata e a massa específica à 20 °C em ensaio único. Com relação à Cromatografia Gasosa (CG/ FID), o resultado foi expresso em porcentagem. Os resultados das análises feitas em duplicata e triplicata foram expressos pela média aritmética desses valores e o desvio padrão.

4.2.1 Índice de acidez

A determinação do índice de acidez foi baseada na metodologia da American Oil Chemists Society (A. O. C. S., 1997). Deste modo, neutralizou-se inicialmente o solvente (álcool etílico comercial) com uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 molar, utilizando uma solução de fenolftaleína 1% em álcool como indicador. Em seguida, mediu-se

aproximadamente 2 g da amostra a ser analisada em um Erlenmeyer de 125 mL. Posteriormente, foram adicionados 50 mL de etanol neutralizado e 2 gotas de fenolftaleína, titulando, em seguida, com a solução de NaOH 0,1 molar, até que uma coloração levemente rosa persistisse por 15 segundos (Figura 18). Por fim, foi anotada a massa das amostras do óleo de pequi bruto e hidrolisados (triplicata) analisadas e os volumes de hidróxido de sódio (NaOH) gastos na titulação para fins da realização dos cálculos conforme as equações 2 e 3.

Figura 18 – Amostras em triplicata de óleo de pequi bruto e hidrolisado titulados com NaOH 0,1 molar.



Fonte: Autor, 2021.

Cálculo de determinação do índice de acidez:

$$IA \left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \right) = \frac{V_x F_x M_x 56,11}{m} \quad (2)$$

Cálculo da porcentagem de ácidos graxos livre:

$$\%AGL(\text{Base Oleico}) = \frac{V_x F_x M_x 28,2}{m} \quad (3)$$

Onde, IA é o índice de acidez; V é o volume gasto de NaOH na titulação; F é o fator da solução de NaOH (sempre próximo de 1); M é a molaridade da solução de NaOH (mol/L); m é a massa molar da amostra utilizada, 56,11 g/mol representa a massa molar de KOH, 28,2 g/mol representa a massa molar do ácido oleico/100 e %AGL é a porcentagem de ácidos graxos, expressa como ácido oleico, em óleos comuns, brutos e refinados (SANTOS, 2011).

A determinação do índice de acidez e da porcentagem de AGL foram realizadas em triplicata e o resultado expresso como média aritmética desses valores e o desvio padrão.

4.2.2 Teor de umidade

A determinação do teor de umidade foi baseada na metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram pesados aproximadamente 5g da amostra de óleo em cápsula de porcelana previamente tarada. Posteriormente, foi aquecida em estufa com recirculação e renovação de ar da marca SOLAB, modelo SL-102 durante 3 horas à $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, resfriada em dessecador por cerca de 30 minutos até a temperatura ambiente. Em seguida a amostra foi pesada. Este procedimento foi repetido até a obtenção de peso constante. O teor de umidade (TU) foi então calculado através da equação (4).

$$\text{TU à } 105\text{ }^{\circ}\text{C (\%)} = 100 \times \left(\frac{m_i - m_f}{m_i} \right) \quad (4)$$

Onde, m_i é a massa inicial da amostra (g) e m_f é a massa final da amostra (g).

A determinação do teor de umidade foi realizada em duplicata e o resultado expresso como média aritmética desses valores e o desvio padrão.

4.2.3 Viscosidade cinemática à 40°C

O método de ensaio utilizado para a obtenção da viscosidade cinemática à 40°C foi baseado na norma ASTM D 88 (ASTM, 1999), através de um viscosímetro do tipo Saybolt Furol com 02 provas da marca CONTENCO. Foram colocadas as rolhas de vedação na saída dos recipientes de recebimento da amostra. Com o auxílio de um funil, foi inserido 60 mL de óleo bruto de pequi. Foram posicionados os fracos receptores sobre o suporte específico. A temperatura de ensaio da amostra foi ajustada para 40°C e confirmada através de termômetro auxiliar. Após atingir a temperatura de 40°C, foi removida a rolha de vedação do bocal de saída e cronometrado o tempo (em segundos) de escoamento do fluido (mL) em orifício padronizado (bico furol).

De acordo com a norma ASTM D88, a equação (5) demonstra a conversão da viscosidade obtida em SFS em viscosidade SSU.

$$\text{SFS} = \frac{\text{SSU}}{10} \quad (5)$$

Onde, SFS é a viscosidade Saybolt Furol Seconds e a SSU viscosidade Saybolt Universal Seconds.

A partir do SSU encontrado na equação (5) foi verificado nos padrões conversão de unidades de viscosidade o valor em Centistokes (cSt) ou mm²/s (Sistema Internacional de Unidades).

Em seguida, calculou-se a equivalência SSU em cSt pelas seguintes equações (6) e (7) (CAETANO,2022):

- Para valores de SSU (Second Saybolt Universal) inferiores a 100:

$$\text{cSt (centiStokes)} = 0,226 \times \text{SSU} - \left(\frac{195}{\text{SSU}}\right) \quad (6)$$

- Para valores de SSU (Second Saybolt Universal) superiores a 100:

$$\text{cSt (centiStokes)} = 0,220 \times \text{SSU} - \left(\frac{135}{\text{SSU}}\right) \quad (7)$$

A determinação da viscosidade cinemática à 40°C foi realizada em triplicata e o resultado expresso como média aritmética desses valores e o desvio padrão.

4.2.4 Massa específica à 20°C

A determinação do valor da massa específica à 20°C foi baseada pela metodologia adaptada do Instituto Adolfo Lutz (2008) onde, primeiramente um picnômetro com volume útil (v) de 25 mL foi lavado e enxaguado com éter. Posteriormente, foi seco naturalmente e pesado com tampa (m₁) em balança analítica de precisão 10⁴ g da marca EDUTECH. Em seguida, o picnômetro foi preenchido com água a 20°C, tampado e pesado (m₂). Após a pesagem, foi descartada a água, onde foi repetido o processo de lavagem e secagem e, na sequência, foi adicionado o óleo de pequi, pesado, determinando assim, sua massa (m₃). A determinação da massa específica à 20°C foi realizada em ensaio único.

A densidade da amostra foi então calculada através da equação (8) abaixo:

$$dL^{t/t} = \left(\frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}\right) \quad (8)$$

Onde, $d_L^{t/t}$ é a densidade do líquido; m_1 é a massa do picnômetro com tampa vazio; m_2 é a massa do picnômetro tampado com água; m_3 é a massa do picnômetro tampado com a amostra (óleo de pequi).

Em seguida, foi calculada a massa específica da água, através da equação (9):

$$P_{H_2O}^t = \left(\frac{m_2 - m_1}{v} \right) \quad (9)$$

Onde, $P_{H_2O}^t$ é a massa específica da água; m_1 é a massa do picnômetro com tampa vazio; m_2 é a massa do picnômetro tampado com água; v é o volume do picnômetro.

Por fim, calculada a densidade do líquido e a massa específica da água, através das equações (8) e (9), foi calculada a massa específica da amostra (óleo de pequi) conforme a equação (10):

$$P_L^t = d_L^{t/t} \times P_{H_2O}^t \quad (10)$$

Onde, P_L^t é a massa específica à 20°C; $d_L^{t/t}$ é a densidade do líquido; $P_{H_2O}^t$ é a massa específica da água.

4.2.5 Determinação do perfil dos ácidos graxos (%) por cromatografia gasosa (CG/ FID)

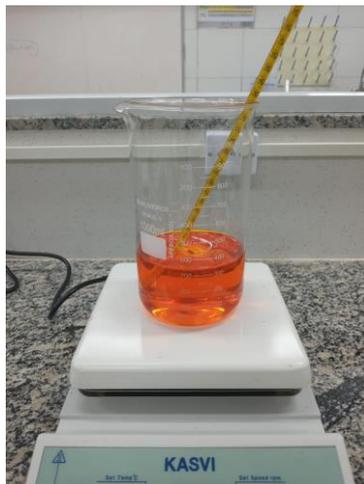
A determinação do perfil dos ácidos graxos do óleo de pequi (bruto e hidrolisado) foi realizada no Núcleo de Tecnologia e Qualidade Industrial do Ceará – NUTEC, Laboratório de Química Instrumental – LQI O Laboratório de Química Instrumental (LQI). Cromatógrafo a gás, modelo Focus GC, marca THERMO; Detector de Ionização de Chama (FID); Coluna: SP-2560 100 m x 0,25 mm ID x 0,2 um; padrão POT-68 – Determinação de Ácidos Graxos em Óleos Vegetais – CG/FID e método Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Edição IV. 2005 (Método 3056/IV, pag. 157).

4.3 Hidrólise do óleo de pequi para obtenção de ácidos graxos

A metodologia utilizada para fazer a hidrólise no óleo bruto de pequi foi baseada na desenvolvida por Ponte (2017) e consistiu em duas etapas: uma básica e outra ácida no intuito de aumentar a quantidade de ácidos graxos livres. Para a realização deste método, 300 g do óleo

de pequi foi inicialmente aquecido a 90 °C com uma agitação mecânica de 500 rpm. Atingido esta temperatura, foi adicionado, por gotejamento, a solução aquosa de NaOH 20 % (m/v) até a amostra solidificar e atingir pH 14, medido através do uso de papel indicador de pH. Em seguida, foi adicionado lentamente a solução aquosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6 mol L^{-1} , mantendo a temperatura a 90 °C e agitação mecânica de 500 rpm, até a mistura ficar totalmente líquida e pH 2,0 medido em papel de indicador de pH. Foi transferido a mistura para um funil de decantação até a separação de fases descartando a fase inferior e, ainda usando o funil de decantação, procedeu-se a lavagem do sobrenadante com água destilada até a água de lavagem atingir o pH 7 e recolhe-se o óleo hidrolisado (ácidos graxos) do funil de decantação e submete-o ao calor até 100 °C para sua secagem (Figura 19).

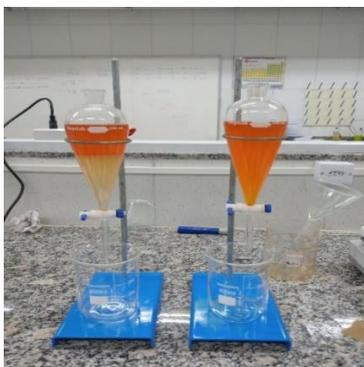
Figura 19 – Etapas da hidrólise: (a) Aquecimento inicial com controle de agitação; (b) Óleo com solução aquosa de NaOH 20 %; (c) Decantação inicial após inserção da solução aquosa de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 6 mol L^{-1} ; (d) Lavagem do óleo hidrolisado.



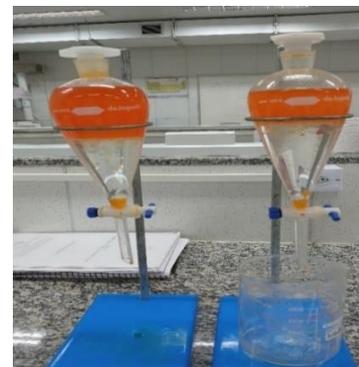
(a)



(b)



(c)



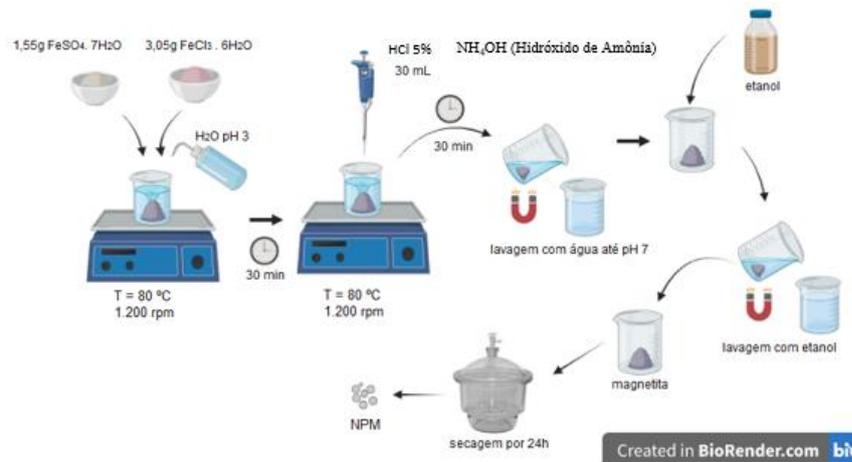
(d)

Fonte: Autor, 2021.

4.4 Síntese do suporte de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)

A síntese das nanopartículas magnéticas foi realizada de acordo com Farias (2017) com adaptações. Sais metálicos contendo Fe^{2+} e Fe^{3+} ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) foram dissolvidos em água destilada na razão molar de 1:2, respectivamente. A solução foi ajustada para pH 3 usando HCl a 5% (v/v) e aquecida a 80°C sob agitação de 1.200 rpm durante 30 min. Em seguida, foi adicionado 30 mL de NH_4OH por gotejamento ainda em aquecimento e agitação por 30 min, sendo formado um precipitado preto. O precipitado foi lavado várias vezes com água destilada até a solução residual atingir a neutralidade, e foi realizada uma única lavagem com metanol. Finalmente, as nanopartículas magnéticas foram secas e armazenadas em dessecador. O suporte foi denominado NPM (Figura 20).

Figura 20 - Esquema da síntese do suporte de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4)



Fonte: Brandão, 2022 (Adaptado).

4.4.1 Tratamento do suporte com g-aminopropiltriétoxisilano (APTES)

O tratamento da funcionalização da magnetita (Fe_3O_4) utilizou 3-aminopropiltriétoxisilano (APTES) segundo metodologia adaptada de Farias (2017). Inicialmente, as nanopartículas magnéticas de ferro foram dispersadas em 300 mL de etanol (95%) sob temperatura ambiente utilizando-se equipamento de ultrassom modelo ECO-SONICS e marca Ultronique por 1h. Logo após, foram adicionados 10 mL de APTES na dispersão que, ainda em sonificação, foi submetido a mais 1h. Após o término deste tempo, as NPM, que se encontram funcionalizadas, foram lavadas 4 vezes com etanol com um auxílio de um ímã, e em seguida, secas em um dessecador a vácuo constante.

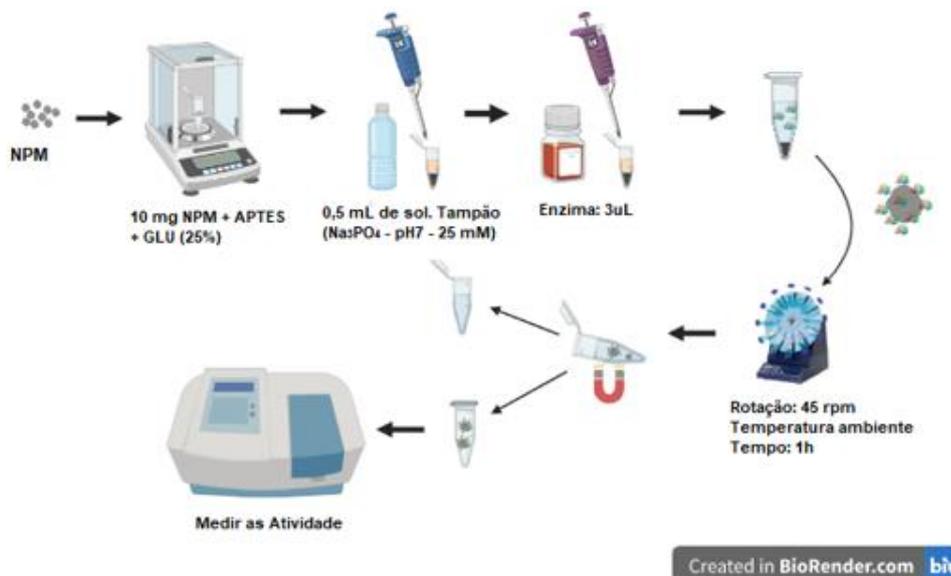
4.4.2 Reticulação com solução de glutaraldeído (GLU)

As nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) foram suspensas em 25% (p/v) de glutaraldeído (GLU), conforme metodologia descrita por Souza et al. (2017). Inicialmente, 25 μL de glutaraldeído foram colocados em contato direto com 10 mg de partículas de magnetita para ativação. A reação foi mantida sob agitação por 2 h a 25°C. Em seguida, os suportes foram lavados três vezes com tampão fosfato de sódio 5 mmol L^{-1} (pH 7) para remover o excesso de glutaraldeído. O suporte foi denominado NPM-GLU.

4.4.3 Imobilização da CALB e Eversa® Transform 2.0 ao suporte

O suporte de nanopartículas magnéticas (tratado por APTES e reticulado com solução de glutaraldeído) foi avaliado em relação à sua capacidade de imobilização. O processo foi realizado pelo contato de 0,01 g de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) com 0,5 mL de solução tampão de fosfato de sódio, 5 mmol L^{-1} , 3 μL de enzima líquida, pH 7,0, 25 °C e sob agitação contínua por 1 h (45 rpm). A enzima imobilizada foi removida da solução por separação magnética. O desempenho da enzima imobilizada foi avaliado e os rendimentos, eficiências e atividades de recuperação calculados de acordo com Sheldon e Van Pelt (2013) (Figura 21).

Figura 21 – Esquema de imobilização enzimática.



Fonte: Brandão, 2022 (Adaptado).

4.4.4 Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima (80 UpNPB/g suporte) foi determinada espectrofotometricamente usando 50 mmol L⁻¹ de butirato de p-nitrofenil (p-NPB) em acetonitrila. A mistura de reação foi preparada misturando 50 µL de p-NPB em 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mmol L⁻¹ a pH 7, e 50 µL da amostra ou 10 mg de biocatalisador a 25 °C. O produto liberado durante a hidrólise de p-NPB, p-nitrofenol, foi quantificado por espectrometria usando um espectrofotômetro modelo V-730 BIO da marca JASCO em um comprimento de onda de 348 nm ($\epsilon = 10,052 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima que hidrolisa 1 µmol de substrato (p-NPB) por minuto, de acordo com às condições citadas acima (Souza et al., 2017). A determinação da atividade enzimática foi obtida utilizando a equação (11).

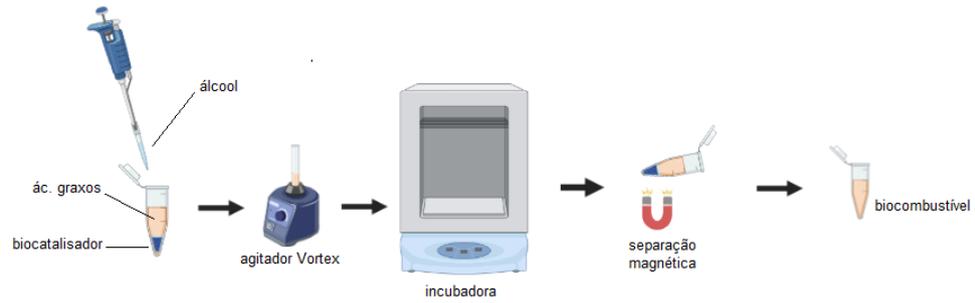
$$\text{Atividade U/g} = \left(\frac{\text{slope} \times 0,175 \times 25\text{mL}}{0,01\text{g}} \right) \quad (11)$$

Onde, slope é o valor encontrado no espectro durante a leitura da amostra, que corresponde a absorvância/tempo de 90 segundos; 0,175: Fator da curva de calibração com p-nitrofenil (pNP) feito no espectro (valor fixo); 25 mL: volume total de líquido no béquer; 0,01 g: peso do derivado.

4.5 Esterificação enzimática heterogênea

A eficiência dos biocatalisadores obtidos foi avaliada por meio de reações de esterificação executados em microtubos plásticos (2,0 ml), contendo 0,5g de óleo pequi hidrolisado como substrato diluído em álcool etílico (0,102 g) ou metílico (0,072 g) na proporção de 1:1 mol L⁻¹, (óleo: álcool) e sem solvente, a 37 °C e 150 rpm por 1h e 8h utilizando 0,01 g do biocatalisador preparado (CALB-NPM / EVERSsa TRANSFORM 2.0-NPM) com uma carga de 80 UpNPB/g suporte, baseado na metodologia de Souza (2013). As reações foram realizadas em triplicata. O biocatalisador foi separado do meio reacional por magnetização e lavado com hexano para remoção de substratos não reagidos e/ou moléculas de produto retidas no microambiente do biocatalisador conforme metodologia de Souza et al., (2017) com adaptações. Em seguida, o biocatalisador foi introduzido em uma nova mistura de reação (Figura 22).

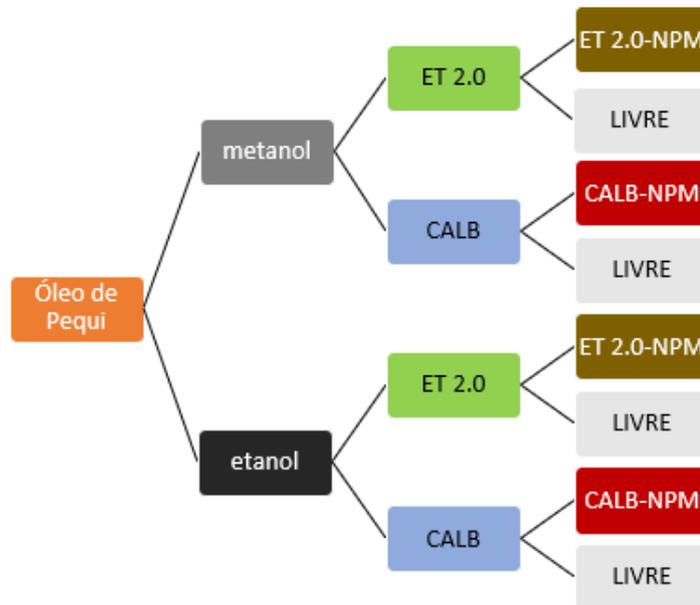
Figura 22 – Esquema de esterificação enzimática heterogênea.



Fonte: Brandão, 2022 (Adaptado).

As sínteses foram realizadas conforme esquema de combinações apresentadas na Figura 23.

Figura 23 – Esquema de combinações para sínteses de biodiesel.



Fonte: Autor, 2022.

4.6 Esterificação enzimática homogênea

Os experimentos de esterificação enzimática homogênea foram baseados na metodologia Souza (2013), onde foram executados em microtubos plásticos (2,0 mL) contendo 0,5g de óleo pequi hidrolisado e 0,072 g de metanol (razão molar 1:1), ou 0,102 g de etanol, bem como 0,01 g de biocatalisador *Candida antarctica* (CALB) ou Eversa® Transform 2.0, ambos na sua forma livre. A reação foi conduzida em agitação orbital por incubadora modelo TE-4200 da Marca TECNAL a 150 rpm, 37°C, nos estudos de 2h, 4h, 6h e 8h. As reações foram realizadas em triplicata.

4.7 Determinação de conversão de ésteres por índice de acidez

Após realizado o processo de esterificação enzimática heterogênea e homogênea, seguindo a metodologia com adaptações de Souza (2013) e Souza et al (2017), objetivando a determinação dos ésteres etílicos e metílicos, foi analisado o índice de acidez pelo método A.O.C.S. (1997) adaptado. As amostras foram analisadas em triplicata, em Erlenmeyer com 0,5g da amostra, 15mL de álcool etílico comercial neutralizado e 2 gotas de fenolftaleína, cada. Foi titulado com a solução de KOH 0,1 molar, até a mudança na coloração para um rosa sutil. Após a titulação, os valores de volume utilizados foram aplicados na Equação (12) para obter o índice de acidez (IA).

$$IA \left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \right) = \frac{V \times F \times M \times 56,11}{m} \quad (12)$$

Onde, V é o volume de KOH utilizado na titulação; F é o fator de correção da solução de KOH; M é a molaridade da solução de KOH (mol/L); m a massa da amostra (g). Os resultados foram calculados em função de porcentagem de conversão de acordo com a equação (13).

$$\text{Conversão (\%)} = 100 \times \left(\frac{IA_i - IA_f}{IA_i} \right) \quad (13)$$

Onde, IA_i e IA_f é o valor do índice de acidez inicial e o valor do índice de acidez final da reação em $\left(\text{mg} \frac{\text{KOH}}{\text{g}} \right)$, respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química do óleo de pequi

As análises físico-químicas do óleo de pequi foram realizadas e comparadas ao de outros óleos vegetais conforme expressam na Tabela 4.

Tabela 4 – Comparativo dos resultados das características físico-químicas do óleo de pequi com outros óleos vegetais.

PROPRIEDADES / RESULTADOS Óleo de pequi (bruto)		Babaçu (<i>in natura</i>)	Castanha do Pará (<i>in natura</i>)	Macaúba (<i>in natura</i>)	Soja (Refinado)
Índice de Acidez (mgKOH/g)	2,32 ± 0,29	3,75 ^I	5,4 ^{II}	67,5 ^{II}	0,3 ^{III}
Ácido Graxo Livre (% de AGL)	1,17 ± 0,14	-	2,7 ^{II}	34,0 ^{II}	-
Teor de Umidade (% em peso)	0,0912 ± 0,003	-	0,33 ^{II}	0,8 ^{II}	-
Massa Específica à 20°C (Kg/m ³)	942,40	921,5 ^I	884 ^{II}	893 ^{II}	920 ^{III}
Viscosidade Cinemática à 40°C (mm ² /s)	41,83 ± 1,29	29,50 ^I	-	-	30,58 ^{IV}

Fontes: PONTE, 2017^I; VIEIRA et al., 2018^{II}; ROCHA, 2018^{III}; HENRIQUE et al., 2012^{IV}.

O valor máximo aceitável do índice de acidez para a produção de biodiesel conforme Resolução ANP N° 45, de 25.8.2014 é 0,50 mgKOH/g. Com isso, óleos vegetais e gorduras animais que apresentam índices de acidez elevados, podem prejudicar o rendimento da produção de ésteres pela formação de glicerol no processo de transesterificação.

Para o óleo de Pequi bruto, o valor encontrado desse parâmetro foi de 2,32 mgKOH/g (± 0,29). No estudo de Ferreira et al., (2019), o valor de índice de acidez foi de 3,24 mgKOH/g (± 0,14); já Santos et al, (2010) relataram o resultado de 3,23 mgKOH/g (± 0,32). Vieira et al, (2018) obtiveram IA de 1,95 mgKOH/g (± 0,01), sendo o mais próximo do resultado do trabalho.

Na Tabela 4, comparando com os estudos de Ponte, (2017); Vieira et al., (2018); Rocha, (2018) para os óleos vegetais *in natura*, sendo, babaçu (3,75 mgKOH/g), castanha do Pará (5,4 mgKOH/g) e macaúba (67,5 mgKOH/g), respectivamente, valores dos índices de acidez foram

superiores ao encontrado no estudo. Já no estudo de Henrique et al., (2012), com relação ao óleo de soja refinado (0,3 mgKOH/g), o valor foi inferior ao obtido no estudo.

Foi realizada uma hidrólise básica e ácida objetivando a transformação de triacilglicerídeos presentes no óleo de pequi bruto em AGL para posterior geração de ésteres por esterificação. Após o processo da hidrólise, o resultado do percentual de ácidos graxos livres (% AGL) aumentou de 1,17% ($\pm 0,14$) para 6,28 % ($\pm 0,18$) perfazendo um percentual de 536%, constando que este processo químico teve a eficiência esperada. Reações de hidrólise básica e ácida podem ocorrer em óleos vegetais uma vez que estes são ésteres, sendo que a hidrólise básica produz o glicerol e os sais de ácidos graxos que fazem parte do óleo. Deste modo, quando estes sais são posteriormente submetidos a uma hidrólise ácida, ocorre a produção de ácidos graxos (PONTES, 2017).

Vieira et al., (2018) esclarecem que, como a acidez de um óleo é oriundo da hidrólise parcial dos glicerídeos existentes em sua composição e não por ser uma propriedade específica de um óleo, as variações dos resultados estão relacionadas com a natureza e qualidade da matéria-prima, com a qualidade e o grau de pureza do óleo e com o modo de extração e tempo de armazenamento.

O resultado do teor de umidade do óleo de pequi bruto foi menor que 0,1% em massa, a saber: 0,0912 % ($\pm 0,003$). Nos estudos de Santos et al, (2010) e Vieira et al, (2018) foram observados os valores de 1,0% ($\pm 0,05$) e 0,31% ($\pm 0,05$), respectivamente.

A determinação do teor de umidade é utilizada como parâmetro para a avaliação da qualidade, estabilidade e composição de óleos e gorduras (VIEIRA et al., 2018). A umidade do óleo pode favorecer a reação de hidrólise, a qual quebra as ligações de éster glicerídeo, ocorrendo à formação de ácidos graxos livres, monoacilglicerídeos, diacilglicerídeos e glicerol, promovendo o aumento da acidez. A presença de água em quantidades indesejáveis favorece a saponificação consumindo o catalisador e diminuindo assim, a eficiência da reação de transesterificação alcalina (LOBATO, 2011).

O resultado da massa específica à 20°C do óleo de pequi bruto foi de 942,40 kg/m³. Resultados próximos foram obtidos nos estudos de Vieira et al, (2018) e Ferreira et al, (2019), sendo, 944,0 Kg/m³ e 915,8 Kg/m³, respectivamente.

A densidade de um material também está relacionada com a sua estrutura química. Portanto, tratando-se dos triglicerídeos e ácidos graxos encontrados em óleos vegetais ou gorduras animais, quanto maior for seu grau de insaturação e menor for sua massa molecular, menor será uma densidade (KNOTHE et al., 2006; LÔBO; FERREIRA; CRUZ, 2009).

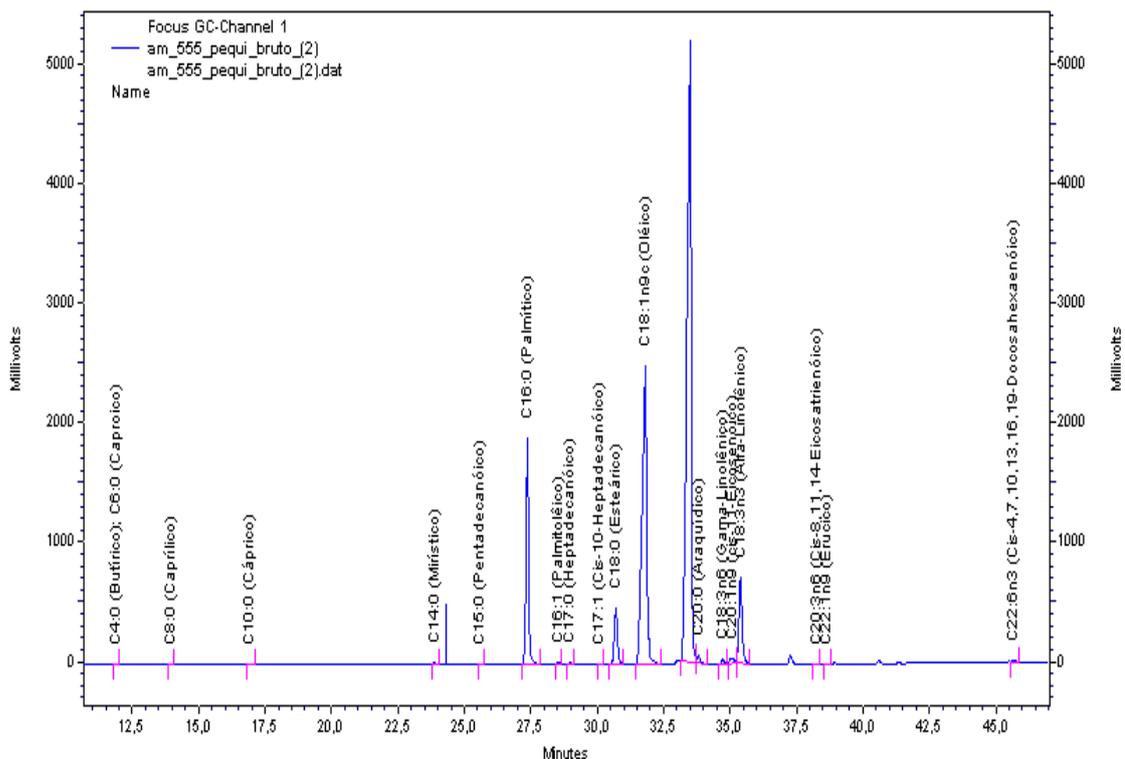
A viscosidade cinemática à 40 °C do óleo de Pequi bruto apresenta 41,83 ($\pm 1,29$) mm²/s, sendo maior quando comparado com o estudo de Ferreira et al. (2019), pelo qual apresenta 34,61 ($\pm 3,76$) mm²/s.

A viscosidade de um fluido é definida como sendo a resistência ao deslizamento de suas moléculas devido à fricção interna, sendo que, quanto maior o grau de fricção de um fluido, maior será sua viscosidade. O significado físico da viscosidade cinemática é o da resistência apresentada por um fluido em escoar, sob a influência da força de gravidade. Na produção de combustíveis, esta propriedade influencia nas propriedades tribológicas, ou seja, nas características de desgaste, atrito e lubrificação, além da qualidade do diesel (cetanagem) e atomização para combustão (ARAÚJO et al, 2010; CAETANO, 2022).

5.1.1 Determinação do perfil dos ácidos graxos (%) por cromatografia gasosa (CG/FID)

Utilizando análise cromatográfica gasosa (CG/FID) das amostras de OPB, a composição do óleo de pequi foi determinada e os dados obtidos encontram-se descritos na Figura 24.

Figura 24 – Cromatograma do óleo de pequi bruto.



Fonte: RE nº 3469/21 - NUTEC, 2021.

Tabela 5 – Ácidos graxos do óleo de pequi bruto obtidos por CG/FID.

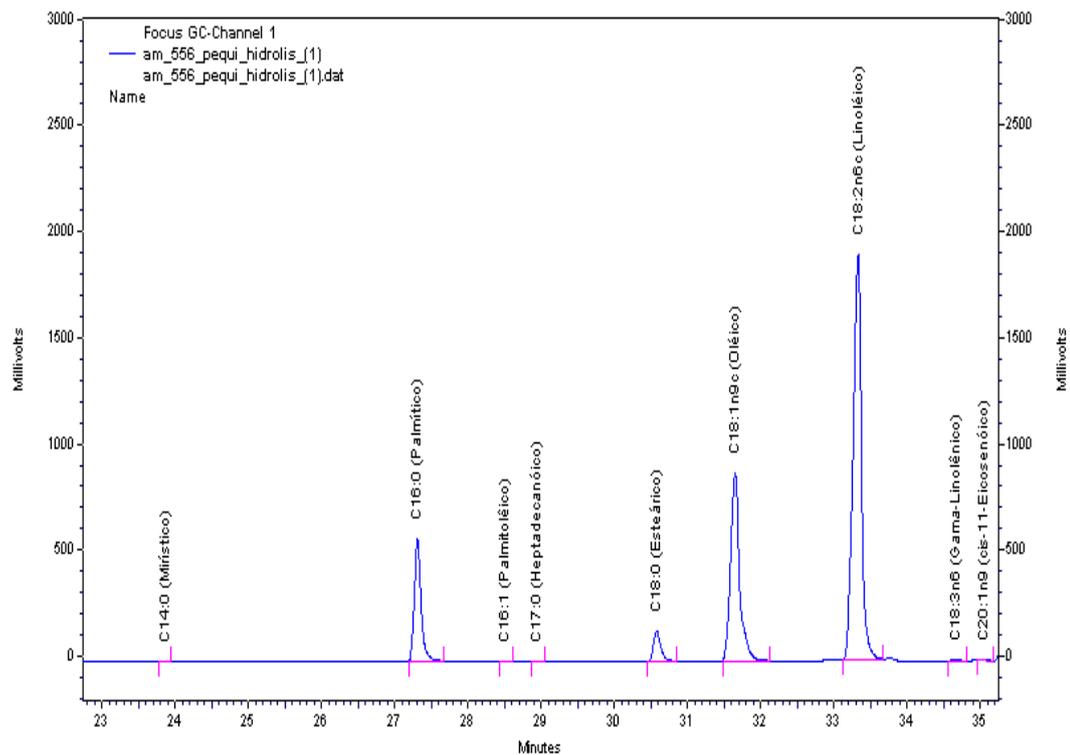
ÁCIDO GRAXO	ESTRUTURA	MASSA MOLAR (g/mol)	CG/FID (%)	(MM*%)
Palmítico	C16:0	256,43	10,93	28,03
Estearico	C18:0	284,48	3,23	9,19
Oléico	C18:1n9c	282,47	24,9	70,34
Linoléico	C18:2n6c	280,44	49,44	138,65
Alfa-Linolênico	C18:3n3	278,43	5,58	15,54
Gama-Linolênico	C18:3n6	278,43	0,27	0,75
Araquídico	C20:0	304,47	0,45	1,37
Cis-11-Eicosenóico	C20:1n9	310,51	0,38	1,18
MM Total (óleo de Pequi bruto)				265,04

Fonte: Autor, 2022.

Conforme Tabela 5 e Figura 24, o perfil de ácidos graxos do OPB revelou um total de 80,57% de insaturados e 14,61% de saturados, sendo que, com relação aos insaturados, do total mencionado, 49,44% é composto de ácido linoléico e 24,9% do ácido oléico, portanto, os componentes majoritários. Outros ácidos graxos encontrados foram: ácido palmítico (10,93%), Alfa-Linolênico (5,58%) e ácido esteárico (3,23%).

Utilizando análise cromatográfica gasosa (CG/FID) das amostras de OPH, a composição do óleo de pequi foi determinada e os dados obtidos encontram-se descritos na Figura 25.

Figura 25 – Cromatograma do óleo de pequi hidrolisado.



Fonte: RE n° 3470/21 - NUTEC, 2021.

Tabela 6 – Ácidos graxos do óleo de pequi hidrolisado obtidos por CG/FID.

ÁCIDO GRAXO	ESTRUTURA	MASSA MOLAR (g/mol)	CG/FID (%)	(MM*%)
Palmítico	C16:0	256,43	12,17	31,21
Palmitolêico	C16:1	254,41	0,08	0,20
Estearíco	C18:0	284,48	3,38	9,62
Oléico	C18:1n9c	282,47	26,71	75,45
Linoléico	C18:2n6c	280,44	52,73	147,88
Gama-Linolênico	C18:3n6	278,43	0,27	0,75
Cis-11-Eicosenóico	C20:1n9	310,51	0,14	0,43
MM Total (óleo de Pequi hidrolisado)				265,54

Fonte: Autor, 2022.

Conforme Tabela 6 e Figura 25, o perfil de ácidos graxos do OPH revelou um total de 79,93% de insaturados e 15,55% de saturados, sendo que, com relação aos insaturados, do total mencionado, 52,73% é composto de ácido linoléico e 26,71% do ácido oléico, portanto, os componentes majoritários. Outros ácidos graxos encontrados foram: ácido palmítico (12,17%) e ácido esteárico (3,38%).

Analisando os perfis de ácidos graxos do OPB e OPH neste estudo, verifica-se que ambos apresentaram o ácido linoléico e oléico como ácidos majoritários. Resultados semelhantes utilizando o óleo de pequi foram obtidos no estudo de Ferreira et al., (2019), sendo o ácido linoléico (46,6%), seguido do ácido oléico (34,2%). Entretanto, estes resultados divergem de outros estudos que também foram utilizados o óleo de pequi apresentando os ácidos palmíticos e oléicos como preponderantes (GUIMARÃES et al., 2022; JOHNER; HATAMI; MEIRELES, 2017). Sendo estes ácidos graxos considerados insaturados, contribuem para a instabilidade química do óleo, pois possuem ligações duplas em suas cadeias (FERREIRA, 2019). Neste sentido, Melo (2010) acrescenta que, quando essas insaturações estão presentes na molécula, como consequência, torna as interações moleculares menos eficientes devido um desfavorecimento estérico e de uma menor viscosidade. Corroborando com este entendimento, Vieira et al., (2018) explicam que, quanto maior o número de ligações insaturadas (duplas), menor serão as interações moleculares e que, com o incremento ligações simples na cadeia carbônica através de ácidos graxos saturados, maiores serão estas interações.

Segundo Ferreira (2019), as diferentes características físico-químicas do óleo de Pequi podem ser justificadas por fatores ambientais do plantio como localização geográfica, clima, solo, amadurecimento do fruto e tempo de colheita. Sobre a influência das características físico-químicas do óleo de pequi, Souza, et al., (2019) destacam que a produção do biodiesel é influenciada pelo perfil de ácidos graxos existentes nesse óleo, explicando ainda que, ésteres

preparados com ácidos graxos insaturados apresentam-se com baixo número de cetano, formação de resíduos sólidos e sofrem mais facilmente os fenômenos da oxidação, degradação e polimerização, sendo mais vulneráveis à reação de hidrólise por contaminação por água que os demais ésteres produzidos quando comparados com ácidos graxos saturados.

5.2 Conversão do biodiesel etílico e metílico de óleo de pequi hidrolisado com as enzimas livres

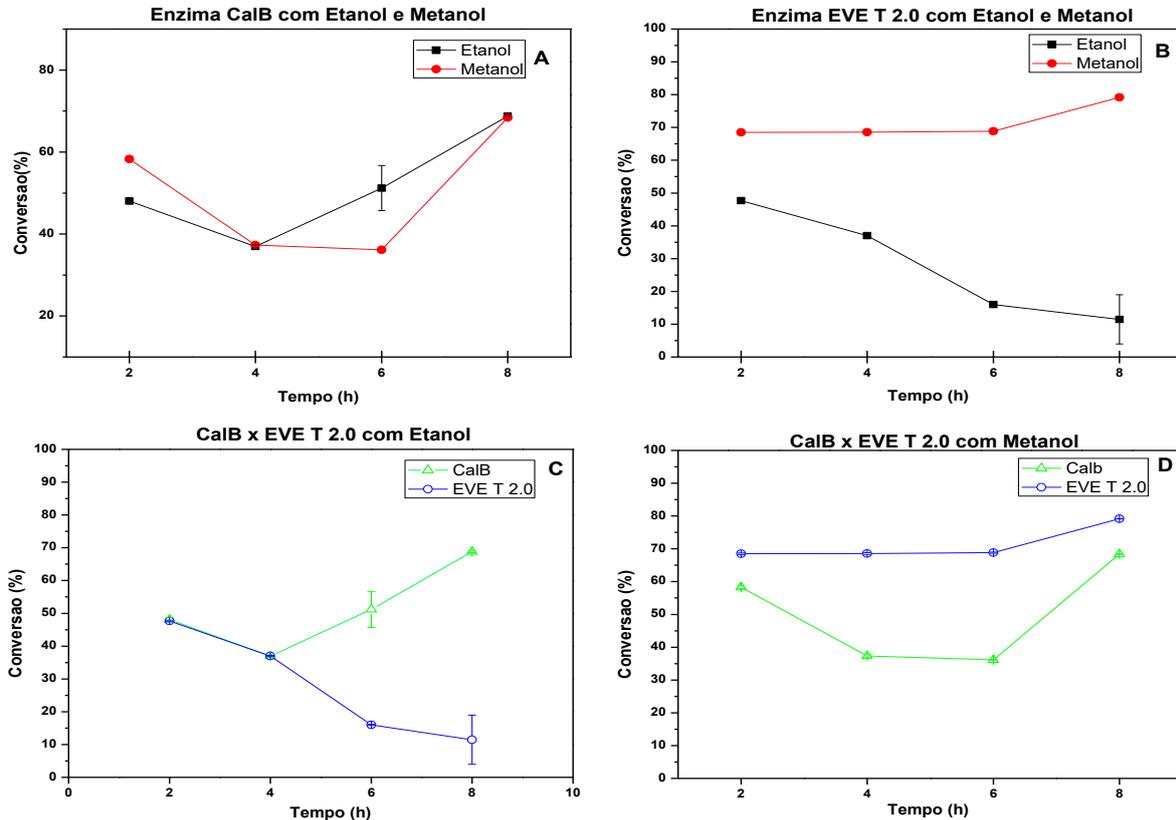
Baseado na metodologia e dos valores ótimos obtidos no estudo de Souza (2013), foi realizado o processo químico de esterificação homogênea do óleo de pequi hidrolisado (OPH) com o álcool etílico e metílico utilizando as enzimas CALB (*Candida antarctica*) e Eversa® Transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*) como biocatalisadores, onde em cada síntese foi adicionada a quantidade equivalente a 80 UpNPBg⁻¹ de enzima livre, respectivamente, nos tempos de reações de 2h, 4h, 6h e 8h, na proporção de 1:1 mol L⁻¹ (óleo:álcool) sob agitação mecânica de 150 rpm à temperatura de 37°C. Os resultados encontram-se na Tabela 7 e Figura 26.

Tabela 7 – Teores de conversões obtidos através de síntese de esterificação através de biocatalisadores CALB e Eversa® Transform 2.0 livres no meio reacional.

SÍNTESE	RENDIMENTO			
	Tempo Reacional (h)			
	2	4	6	8
	Teor (%)	Teor (%)	Teor (%)	Teor (%)
Pequi/CALB/Etanol	48,04 ±0,69	36,96 ±0,33	51,21 ±5,50	68,77 ±0,25
Pequi/CALB/Metanol	58,30 ±0,37	37,33 ±0,32	36,14 ±0,09	68,39 ±0,04
Pequi/ET 2.0/Etanol	47,67 ±0,21	37 ±0,19	16,03 ±0,12	11,47 ±7,49
Pequi/ET 2.0/Metanol	68,50 ±0,24	68,56 ±0,28	68,85 ±0,17	79,17 ±0,03

Fonte: Autor, 2022.

Figura 26 - Síntese de ésteres utilizando óleo de pequi hidrolisado e os álcoois etílico (1:1) e metanol (1:1) como sistemas alcoólicos e as enzimas CALB e Eversa® Transform 2.0, ambas, na forma livre: (A) Enzima CALB com (■) etanol e (●) metanol; (B) Enzima Eversa® Transform 2.0 com (■) etanol e (●) metanol; (C) Enzimas (Δ) CALB e (O) Eversa® Transform 2.0 com etanol; (D) Enzimas (Δ) CALB e (O) Eversa® Transform 2.0 com metanol.



Conforme a Figura 26-B, o melhor resultado da conversão catalítica utilizando os biocatalisadores e os álcoois na forma livre no meio reacional neste estudo foi de 79,17% (8h) com a lipase Eversa® Transform 2.0 e metanol, sendo que, nos tempos reacionais de 2h a 6h praticamente não houve variação significativa de conversão, apresentando uma média de 68,6% neste intervalo. Portanto, com o aumento do tempo reacional, ocorreu um aumento de conversão catalítica em 15,6% de ésteres metílicos de ácidos graxos, considerando o tempo inicial de 2h e o final de 8h, sendo assim resultados promissores para a produção de biodiesel. Valores de conversões inferiores foram encontrados quando na utilização da enzima Eversa® Transform 2.0 com etanol e um comportamento decrescente foi observado, considerando os tempos reacionais de 2h a 8h, obtendo assim, uma redução de 24,0% de ésteres etílicos de ácidos graxos considerando o tempo inicial de 2h e final de 8h.

Segundo estudos de Chang, Chan e Song (2021), a tolerância da enzima líquida Eversa® Transform 2.0 ao metanol pode ser atribuída ao ambiente mais brando criado pela água gerada pela esterificação dos AGL acarretando a criação de mais áreas interfaciais para a reação, que pode aumentar a taxa de reação e, conseqüentemente, a conversão em ésteres metílicos de ácidos graxos o que justificaria os bons resultados deste estudo. Contudo, o excesso de metanol afetaria a estabilidade da enzima, o que poderia levar à desnaturação desta de forma irreversível.

Já com relação a CALB, o estudo demonstrou que conversões máximas próximas de 69,0% (8h) foram obtidas utilizando tanto o etanol quanto metanol, sendo resultados promissores. No tempo reacional de 4h, os valores de conversões da CALB com etanol e metanol foram praticamente os mesmos com uma média de 37% (Figura 26-A).

Pedro et al., (2019) relataram em seu estudo que, utilizando a enzima CALB livre para síntese enzimática de ésteres etílicos de ácido graxo oleico, um valor máximo de conversão foi obtido, sendo de 39% nas condições ótimas de temperatura à 40°C no tempo reacional de 30 minutos, enfatizando que os rendimentos de ésteres etílicos de ácidos graxos obtidos com a CALB indicam que esta lipase apresenta melhor desempenho em reações de esterificação do que as de transesterificação.

Sun, Gun e Chen, (2021) pesquisaram sobre o comparativo de três lipases líquidas comerciais, Eversa®Transform 2.0, CALA e CALB para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo da semente de *Semen Abutil* e concluíram que, entre as lipases testadas, a Eversa®Transform 2.0 foi a que obteve rendimento máximo de biodiesel, equivalente a 94,2 % ($\pm 1,3$) sob as seguintes condições ideais: carga de lipase 6%, teor de água 20%, óleo 1:7 (mol/mol) para etanol, 11 h, 37 °C.

Valores próximos de conversão de ésteres etílicos utilizando CALB e etanol no tempo reacional de 4h foram observados do estudo de Pedro, (2018), obtendo uma conversão do óleo ácido em ésteres etílicos de 32%, nos seguintes parâmetros racionais: razão óleo:etanol (1:1), 30°C. Ressalta ainda no seu estudo que a CALB possui as seguintes características: geralmente apresenta alta atividade para ácidos graxos de cadeia curta e média e baixa atividade para cadeias longas; é muito estereosseletiva para álcoois secundários; não sofre ativação interfacial.

5.3 Conversão heterogênea do óleo de pequi hidrolisado com as enzimas CALB e Eversa® Transform 2.0 e reutilização da lipase imobilizada.

Baseado na metodologia e dos valores ótimos obtidos no estudo de Souza (2013), foi realizado o processo químico de esterificação heterogênea do óleo de pequi hidrolisado (OPH)

na presença de álcool etílico ou metílico utilizando as enzimas CALB (*Candida antarctica*) ou Eversa® Transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*) como biocatalisadores imobilizados em nanopartículas magnéticas de ferro (Fe_3O_4) com quantidade equivalente a $80 \text{ U}_{\text{PNP}}\text{g}^{-1}$, na proporção de 1:1 mol L^{-1} (óleo:álcool) sob agitação mecânica de 150 rpm à temperatura de 37°C e tempo reacionais de 1h e 8h. O biocatalisador foi separado do meio reacional por magnetização e lavado com hexano para remoção de substratos não reagidos e/ou moléculas de produtos retidas no microambiente do biocatalisador. Em seguida, o biocatalisador foi introduzido em uma nova mistura de reação.

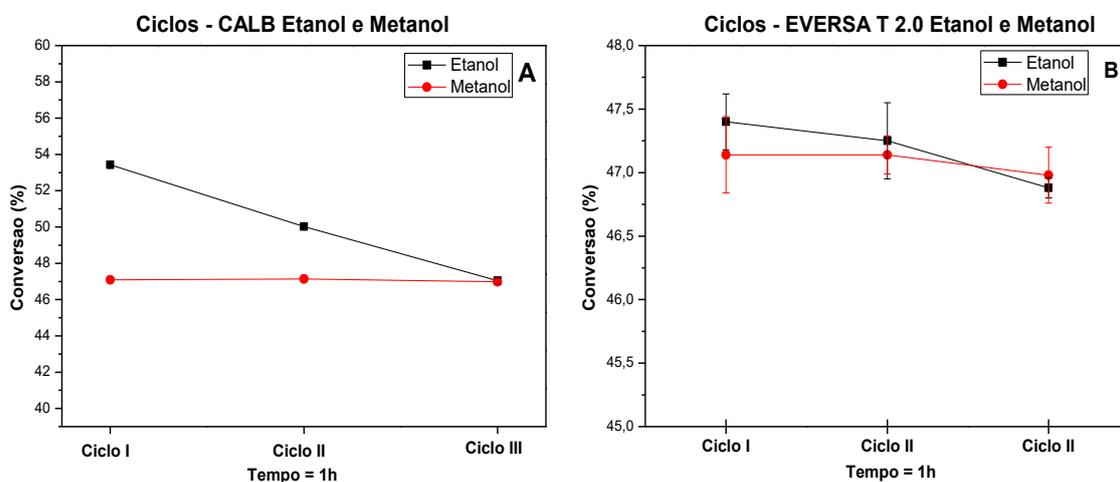
Os resultados dos rendimentos para o tempo reacional de 1h encontram-se na Tabela 8 e Figura 27.

Tabela 8 – Teores de conversões obtidos através de síntese de esterificação através de biocatalisadores CALB e Eversa® Transform 2.0 imobilizados em NPM no tempo de 1h.

SÍNTESE	RENDIMENTO		
	CICLO I	CICLO II	CICLO III
	Teor (%)	Teor (%)	Teor (%)
Pequi/CALB-NPM/Etanol	$53,43 \pm 0,19$	$50,03 \pm 0,07$	$47,04 \pm 0,15$
Pequi/CALB-NPM/Metanol	$47,09 \pm 0,07$	$47,14 \pm 0,15$	$46,98 \pm 0,07$
Pequi/ET 2.0-NPM/Etanol	$47,40 \pm 0,22$	$47,25 \pm 0,30$	$46,88 \pm 0,08$
Pequi/ET 2.0-NPM/Metanol	$47,14 \pm 0,30$	$47,14 \pm 0,15$	$46,98 \pm 0,22$

Fonte: Autor, 2022.

Figura 27 – Rendimento do biodiesel e reutilização da lipase imobilizada: (A) Enzima CALB com (■) etanol e (●) metanol; (B) Enzima Eversa® Transform 2.0 com (■) etanol e (●) metanol; Reação condições: razão molar óleo/álcool (1:1); dosagem de catalisador, $\text{Att} = 80 \text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$; tempo de reação: ciclos de 1 h cada, temperatura de reação, 37°C .



O estudo demonstra que, no geral, considerando todos os parâmetros reacionais para uma 1(h), praticamente não houve redução significativa de conversão para os três ciclos pressupondo manutenção das atividades catalíticas. No ciclo I, com o biocatalisador CALB-NPM/Etanol, foi obtido um rendimento de 53,43%, ficando próximo ao melhor resultado da EVERSA TRANSFORM 2.0-NPM/Etanol, que foi de 47,40 %, uma diferença de apenas 11,28 %. Após 3 ciclos de reuso, a conversão diminuiu apenas 12 % na produção de ésteres etílicos. Já utilizando o CALB-NPM/Metanol, apesar de apresentar valores de conversões menores quando comparados aos do biocatalisador CALB-NPM/Etanol em todos os três ciclos, em média 47%, o percentual de redução da atividade deste biocatalisador foi de 0,2% após 3 ciclos de reuso.

Os pesquisadores Carneiro, Marques e Gonçalves, (2014) em um estudo de produção de ésteres através de esterificação enzimática de ácidos graxos de óleo de coco utilizando lipase de CALB imobilidade covalentemente em um suporte de quitosana nas seguintes condições ótimas: quantidade de enzima oferecida de 65 U.g^{-1} , 150 rpm, razão óleo:etanol (1:1), 8h, temperatura de 45°C , obtiveram conversão 73,25 %, mantendo sua atividade até o final de 10 ciclos.

Utilizando os biocatalisadores EVERSA TRANSFORM 2.0-NPM/Etanol e EVERSA TRANSFORM 2.0-NPM/Metanol, o estudo revelou que em ambos ocorreram reduções ínfimas de conversões após 3 ciclos de reuso, sendo 1,1% e 0,3%, respectivamente.

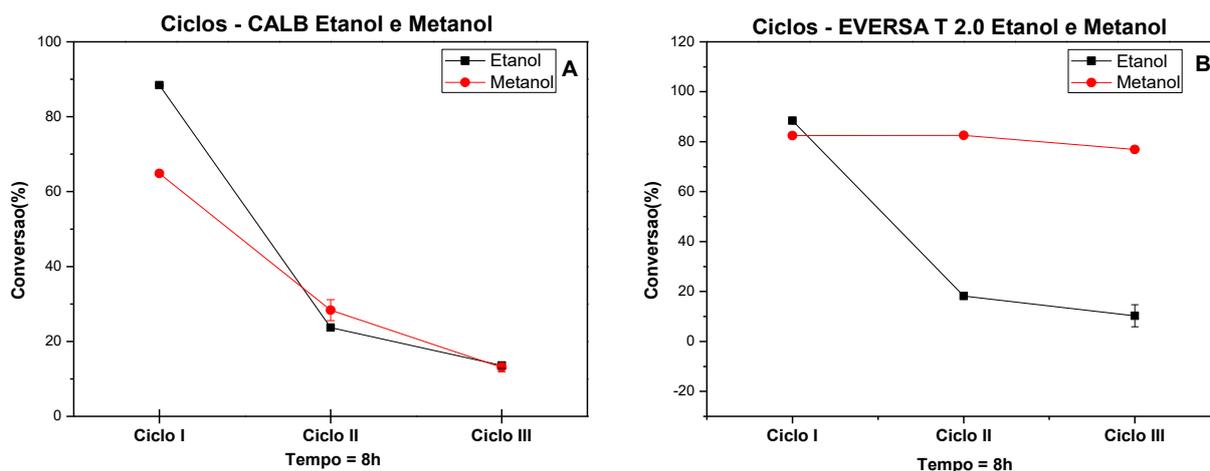
Para o tempo reacional de 8h, conforme exposto na Tabela 9 e Figura 28, o estudo mostra que a máxima conversão entre os ciclos foi de 88,44% utilizando CALB-NPM/Etanol no ciclo I com redução considerável na conversão já no ciclo II (73%) e após 3 ciclos de reuso, 85%. Comportamentos semelhantes de redução acentuada de conversão após o reuso foram observados quando utilizados os biocatalisadores CALB-NPM/Metanol e EVERSA TRANSFORM 2.0-NPM/Etanol, sendo que o percentual de redução da conversão após o ciclo I foi de 56% e 80% e após 3 ciclos de reuso foi de 81% e 88%, respectivamente. Entretanto, as sínteses utilizando EVERSA TRANSFORM 2.0-NPM/Metanol foram promissoras tendo em vista que a conversão média foi de aproximadamente 81% de ésteres metílicos e houve uma redução ínfima de atividade após 3 ciclos de reuso, sendo de apenas 7%, pressupondo manutenção das atividades catalíticas nestas condições.

Tabela 9 – Teores de conversões obtidos através de síntese de esterificação através de biocatalisadores CALB e Eversa® Transform 2.0 imobilizados em NPM no tempo de 8h.

SÍNTESE	RENDIMENTO		
	CICLO I	CICLO II	CICLO III
	Teor (%)	Teor (%)	Teor (%)
Pequi/CALB-NPM/Etanol	88,44 ±0,13	23,70 ±0,38	13,56 ±0,76
Pequi/CALB-NPM/Metanol	64,85 ±0,31	28,34 ±2,82	13,11 ±1,20
Pequi/ET 2.0-NPM/Etanol	88,40 ±0,07	18,15 ±0,77	10,30 ±4,46
Pequi/ET 2.0-NPM/Metanol	82,46 ± 0,12	82,55 ±0,23	76,90 ±0,03

Fonte: Autor, 2022.

Figura 28 – Rendimento do biodiesel e reutilização da lipase imobilizada: (A) Enzima CALB com (■) etanol e (●) metanol; (B) Enzima Eversa® Transform 2.0 com (■) etanol e (●) metanol; Reação condições: razão molar óleo/álcool (1:1); dosagem de catalisador, Att= 80 U.g⁻¹; tempo de reação: ciclos de 8 h cada, temperatura de reação, 37 °C.



Alguns pesquisadores explicam possíveis causas da desativação enzimática, o que pode elucidar os resultados apresentados da queda de conversão a partir do segundo ciclo. Sobre os catalisadores heterogêneos, Machado, (2017) explica que não possuem tempo indefinido de atividade, pois estão submetidos à desativação por perda de atividade relativa ao tempo através do fenômeno de envelhecimento ocasionado pela modificação estrutural da superfície cristalina ou depósitos de materiais estranhos dentro das porções ativas do catalisador. Santin, (2013) relata que a hidrofobicidade dos solventes orgânicos influencia a atividade da enzima e a especificidade dos substratos. Em complemento das possíveis justificativas, Rocha, (2018) em sua pesquisa sobre catálise enzimática para a produção de biodiesel a partir de óleo residual de andiroba, revela que o decaimento do rendimento a partir do segundo ciclo possa ter ocorrido pela utilização do hexano (solvente orgânico) utilizado para extrair os ácidos graxos no final de

cada processo, pois cogita-se que o hexano residual contido na fração enzimática não evaporou após a separação reduzindo o poder catalítico devido uma possível alteração da estrutura tridimensional da enzima.

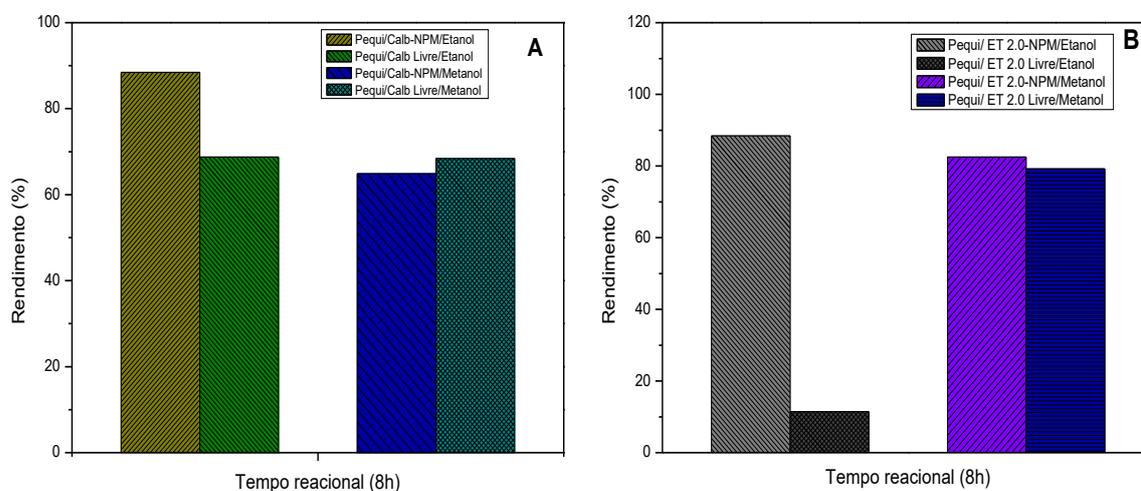
5.4 Comparativo do uso da enzima livre x enzima imobilizada

Foi realizado um comparativo entre as sínteses de esterificação de AGL do óleo de pequi hidrolisado na temperatura de 37°C, agitação de 150 rpm e 8h com os biocatalisadores CALB e Eversa Transform 2.0 nas formas livres e imobilizados em NPM com etanol e metanol, no intuito de analisar o protocolo mais viável tecnicamente.

Conforme Figura 29 (A), o estudo demonstrou que, o rendimento da esterificação Pequi/CALB-NPM/Etanol foi superior quando comparado a síntese Pequi/CALB Livre/Etanol. Já quando utilizando metanol ao invés do etanol nas duas situações anteriores, os rendimentos foram próximos.

De acordo com a Figura 29 (B), percebe-se uma diferença considerável de rendimento (75,93%) do Pequi/ET 2.0-NPM/Etanol, que foi bem superior quando comparado à síntese Pequi/ET 2.0 Livre/Etanol. Entretanto, quando utilizando metanol, percebe-se um discreto aumento da ET 2.0 imobilizada quando comparada na sua forma livre.

Figura 29 – Comparativo dos rendimentos obtidos das reações de esterificação dos ácidos graxos livres do óleo hidrolisado de Pequi na temperatura de 37°C, agitação de 150 rpm e 8h com biocatalisadores CALB (A) e Eversa Transform 2.0 (B) nas formas livres e imobilizados em NPM com etanol e metanol.



6 CONCLUSÕES

O óleo de pequi apresentou os seguintes ácidos graxos majoritários em sua composição: Oléico e Linoléico, sendo ácidos graxos potenciais para a síntese de biodiesel.

Foi comprovada a transformação de triacilglicerídeos presentes no óleo de pequi bruto em ácidos graxos livres pelo processo de hidrólise, o que favoreceu a produção de biodiesel por esterificação.

Na síntese homogênea, a combinação da enzima Eversa® Transform 2.0 com metanol na forma livre no meio reacional apresentou melhor viabilidade de conversão catalítica de ácidos graxos livres em ésteres do que utilizando a enzima CALB.

Na síntese heterogênea, a combinação da enzima Eversa® Transform 2.0-NPM com metanol foi a mais viável tecnicamente.

Os resultados foram considerados promissores, com isso, novos estudos devem ser realizados para aperfeiçoamento da técnica utilizada, pois, o estudo apresentou valores de teores de conversões de ésteres próximos ao exigido pela Resolução ANP N° 45 de 25/08/2014 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis.

Tendo como base os resultados obtidos neste trabalho, as seguintes sugestões podem ser delineadas:

- Avaliar a estabilidade térmica das lipases CALB e Eversa® Transform 2.0 imobilizadas em nanopartículas magnéticas;
- Estudar a viabilidade econômica da produção de biodiesel por rota enzimática utilizando Eversa® Transform 2.0 imobilizada em nanopartículas magnéticas;
- Aprimorar a configuração das variáveis do sistema reacional para emprego na produção de biodiesel por rota enzimática;
- Caracterização da nanopartícula magnética utilizada como suporte heterogêneo para síntese enzimática de biodiesel;
- Estudar a imobilização das lipases CALB e Eversa® Transform 2.0 em outros suportes alternativos de menor custo e facilidade de separação da enzima visando economia do processo e minimizando problemas no reuso em reações de hidroesterificação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. S. de. et. al. Óleo de pequi (*Caryocar brasiliense Camb*) métodos de extração, constituição química e propriedades medicinais. **Diversitas Journal. Santana do Ipanema/AL**. vol. 3, n. 3, p.557-563, set./dez. 2018. ISSN 2525-5215. Disponível em: <https://diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/581>. Acesso em: 05 out. 2021.

American Oil Chemists Society, AOCS. **Official Method Cd-3d-63 Acid Value**, 1997. 2p.

American Society for Testing and Materials – **ASTM. D 88 – 94 - Standard Test Method for Saybolt Viscosity. 94 (Reapproved 1999)**.

ANGAJALA, G.; PAVAN, P.; SUBASHINI, R. Lipases: An overview of its current challenges and prospectives in the revolution of biocatalysis. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. 7(2016)257–270. 1878-8181/& 2016 Elsevier Ltd.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **RESOLUÇÃO ANP Nº 45, DE 25.8.2014** - DOU 26.8.2014. Disponível em: <<http://legislacao.anp.gov.br/?path=legislacao-anp/resol-anp/2014/agosto&item=ranp-45-2014>>. Acesso em: 15 out. 2020.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Especificação Do Biodiesel**. Atualizado: Terça, 15 de setembro de 2020. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/producao-de-biocombustiveis/biodiesel/biodiesel-bio>>. Acesso em: 15 out. 2020.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Nota Técnica Conjunta Nº 10/2021/ANP – Proposta de um novo modelo de comercialização de biodiesel**. Rio de Janeiro, 14 de abril de 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/ntconj2021.pdf>>. Acesso em: 07 jul. 2022.

ANP - Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Painel Dinâmico de Produtores de Biodiesel**. Atualizado em 24/03/2022 16h22. Disponível em: <<https://www.gov.br/anp/pt-br/assuntos/producao-e-fornecimento-de-biocombustiveis/biodiesel/painel-dinamico-de-produtores-de-biodiesel>>. Acesso em: 05 nov. 2022.

ARAÚJO, P. H. P. Et al. Análise Sobre a Viscosidade do Biodiesel. **VI Congresso Nacional de Engenharia Mecânica**. 18 a 21 de agosto 2010, Campina Grande – Paraíba.

ARPINI, B. H. et. al. Catalisadores Simples de Nióbio Aplicados em Sistemas Assistidos por Ultrassom e Refluxo para Síntese de Biocombustíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**. Vol. 30 nº9 São Paulo. Epub 16 set. 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532019000901897&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.

BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. An investigation of lipase catalysed sonochemical synthesis: A review. **Ultrasonics Sonochemistry**. 38 (2017) 503–529.

BARBOSA, C. O. et. al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: A useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Adv**. 2013, DOI: 10.1039/C3RA45991H. View Article Online. View Journal.

BASTIANELLO, R. T. **Síntese de biodiesel via catálise enzimática em meio orgânico e em líquidos iônicos**. Universidade Federal do Pampa. Monografia (Graduação). 63 f. 29 de julho de 2011.

BELTRÃO, N. E. DE M.; OLIVEIRA, M. I. P DE. EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Oleaginosas potenciais do nordeste para a produção de biodiesel**. ISSN 0103-0205. Dezembro, 2007. Disponível em: <<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/277417/1/DOC177.pdf>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

BIODIESELBR. **Demanda de biodiesel pode atingir 9,5 bi de litros com B15 em 2023, diz EPE**. BiodieselBR.com – epbr 27 jan. 2023. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/regulacao/politica/demanda-de-biodiesel-pode-atingir-9-5-bi-de-litros-com-b15-em-2023-diz-epe-270123>>. Acesso em: 15 mar. 2023.

BÔA MORTE, E. de F. **Suporte modificados com propriedades superparamagneticas**. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. 119 f. Campos dos Goytacazes, 2017.

BRADFORD, M. M. **Um método rápido e sensível para a quantificação de quantidades de microgramas de proteína que utiliza o princípio da ligação proteína-corante**. *Bioquímica analítica*, 1976, 72 (1-2), 248-254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRANDÃO JÚNIOR, J. **Síntese de biodiesel de babaçu e tucumã catalisado por enzimas lecitase e eversa**. Dissertação (mestrado) – Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPPG). Instituto de Engenharias e Desenvolvimento Sustentável (IEDS). Programa de Pós-Graduação em Energia e Ambiente (PGEA), 92 p. Redenção/CE – 2022.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. **Impactos da pandemia de Covid-19 no mercado brasileiro de combustíveis: Reflexos na demanda de combustíveis, na oferta de derivados de petróleo, no setor de biocombustíveis, e análises sobre a arrecadação**. NT-EPE-DPG-SDB-2020-02, 02 de junho de 2020.

EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA – EPE. **Balanco Energético Nacional 2022**. Relatório Síntese / Ano Base 2021. Disponível em: <https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-675/topico-631/BEN_S%C3%ADntese_2022_PT.pdf>. Acesso em: 5 nov. 2022.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica, v. 2. 4 ed. São Paulo**, Pearson Prentice Hall, 2006.

CANESIN, E. A. et al. Caracterização de Óleos Residuais para Produção de Biodiesel. **Elétron. J. Biotechnol.** Vol.17 nº1 Valparaíso ene. 2014. Versão On-line ISSN 0717-3458. Disponível em: <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582014000100007&lang=pt>. Acesso em: 28 ago. 2020.

CAETANO, M. **Viscosidade**. Ciência e Tecnologia da Borracha - CTB. Disponível em: <<https://www.ctborracha.com/borracha-sintese-historica/materias->

primas/plastificantes/plastificantes-de-origem-natural-2/plastificantes-de-origem-mineral/propriedades-dos-plastificantes-mineraisderivados-do-petroleo/viscosidade/> Acesso em: 01 ago. 2022.

CARNEIRO, E. A.; MARQUES, M. L.; GONÇALVES, L. R. B. Esterificação enzimática de ácidos graxos de óleo de coco utilizando lipase de *Candida antarctica*. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química - COBEQ 2014**. 19 a 22 de outubro de 2014 Florianópolis/SC. Disponível em: < <https://www.proceedings.blucher.com.br/article-list/cobeq2014-245/list#articles>>. Acesso em: 05 jul. 2021.

CARVALHO L. M. G. de et al. Catálise heterogênea proporciona biodiesel de babaçu, óleo de mamona e misturas. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**. Vol.24 n°4 São Paulo abr. 2013. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532013000400005&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.

CHANG, M. Y.; CHAN, E. S.; SONG, C. P. Biodiesel production catalysed by low-cost liquid enzyme Eversa® Transform 2.0: Effect of free fatty acid content on lipase methanol tolerance and kinetic model. **Fuel** **283** (2021). 119266. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.119266>.

CHRISTOPHER, L. P. Et al. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. **Applied Energy**, v. 119, (2014) pg. 497-520. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2014.01.017>.

CNCFlora – Centro Nacional de Conservação da Flora. ***Caryocar brasiliense* Cambess - Informações sobre a espécie**. Informações da avaliação de risco de extinção 2012. Disponível em: < <http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Caryocar%20brasiliense>>. Acesso em: 07 set. 2022.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - Conab. **Boletim da Sociobiodiversidade**. B. Sócio biodiversidade, Brasília, v. 6, n. 1, p. 1-36, março de 2022. ISSN 2527-1598 Disponível em: <https://www.conab.gov.br/component/k2/item/download/43473_534f53ac12341ff8433fbaa572014874>. Acesso em: 12 mar. 2023.

COSTA, P. P. K. G. **Catalisadores químicos utilizados na síntese de biodiesel**. Brasília, DF: Embrapa Agroenergia, 2011. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/55583/1/doc-07.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

OLIVEIRA, et al. Fatty acid alkyl esters obtained from babassu oil using C₁–C₈ alcohols and process integration into a typical biodiesel plant. **Chemical Engineering Research and Design**. 160 (2020). 224–232. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2020.05.028>.

DEUS, T. N. de. **Extração e caracterização de óleo do pequi (*Caryocar brasiliensis* camb.) para o uso sustentável em formulações cosméticas óleo/água (o/a)**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Católica de Goiás, 75 p. Goiânia, 2008.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Embrapa pesquisa produção de biodiesel com catalisadores enzimáticos**. 2013. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1473585/embrapa-pesquisa-producao-de-biodiesel-com-catalisadores-enzimaticos>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Catálise enzimática produz biodiesel mais verde**. 2011. Disponível em: <<https://www.biodieselbr.com/noticias/em-foco/catalise-enzimatica-biodiesel-verde-020311#:~:text=A>>. Acesso em: 28 ago. 2020.

EPBR. **CNPE reduz mistura de biodiesel para 10% em 2022**. Nayara Machado, 29 de novembro de 2021, em Biocombustíveis, Política energética. Disponível em: <<https://epbr.com.br/cnpe-reduz-mistura-de-biodiesel-para-10-no-periodo-2022/#:~:text=O>>. Acesso em: 06 nov. 2022.

FAN, Y.; QIAN, J. Lipase catalysis in ionic liquids/supercritical carbon dioxide and its applications. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic** 66 (2010). 1–7. Doi:10.1016/j.molcatb.2010.03.004.

FACIN, B. R. et al. Strategies for the Immobilization of Eversa® Transform 2.0 Lipase and Application for Phospholipid Synthesis. **Catalysts**. 2021, 11, 1236. <https://doi.org/10.3390/catal11101236>

FARIAS, M. Y. V. de. **Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas visando aplicação na produção de ésteres**. Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Curso de Engenharia Química, Fortaleza, 2017.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, p. 185–197, 1998. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9720258/>>. Acesso em: 28 dez. 2021.

FERREIRA, E. N. **Utilização de Pequi (*Caryocar brasilienses Camb.*): para produção sustentável de combustíveis e lubrificantes**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2019. 81 f.

FERREIRA, E. N., et al. Investigation of the thermal degradation of the biolubricant through TGFTIR and characterization of the biodiesel – Pequi (*Caryocar brasiliensis*) as energetic raw material. **Fuel** **245** (2019) 398–405.

FRAGA, F. C. et al. Effect of magnetic field on the Eversa®Transform 2.0 enzyme: Enzymatic activity and structural conformation. **International Journal of Biological Macromolecules** **122** (2019) 653–658.

GAMA, P. E.; GIL, A. S. S.; LACHTER, E. R. Produção de Biodiesel Através de Transesterificação In Situ de Sementes de Girassol Via Catálise Homogênea e Heterogênea. **Quim. Nova**. Vol. 33, nº. 9, 1859-1862, 2010. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000900007 >. Acesso em: 29 set. 2020.

GAMBA, M. **Produção de biodiesel através de catálise enzimática em líquido iônico**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto De Química Programa de Pós-Graduação em Química. 68f. Abril de 2009. Porto Alegre - RS.

GEHLING, R. **Alternativas à matriz energética brasileira: o caso do biodiesel.** Monografia (graduação). Universidade Federal De Santa Catarina Curso De Graduação Em Ciências

Econômicas. 81.f. Florianópolis, julho de 2007. Disponível em: < <http://tcc.bu.ufsc.br/Economia293458.pdf>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

GONZÁLEZ, A. F. R.; GALLEGO, E. G.; CASTAÑEDA, H. G. T. Variáveis de operação na transesterificação de óleo vegetal: uma revisão da catálise enzimática. **Ing. Investig.** Vol.30 nº.1 Bogotá abr. 2010. Disponível em: < www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-56092010000100003&lang=pt >. Acesso em: 29 set. 2020.

GUIMARÃES, M. G. **Produção de biocombustível líquido a partir de resíduo agroindustrial: caroço de pequi.** Monografia (graduação) – Universidade de Brasília Instituto de Química, Brasília, 2015.

GUIMARÃES, M. G. et al. Extraction and Characterization of Pequi Seed Oil for Biodiesel Production. **J. Braz. Chem. Soc.**, Vol. 33, No. 4, 327-339, 2022. <https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20210151>.

HENRIQUE, M. A. Et al. Caracterização Físico-química do biodiesel de soja produzido através da transesterificação etílica. **52º Congresso Brasileiro de Química (CBQ). Química e Inovação: Caminho para a sustentabilidade.** 14 a 18 de outubro de 2012, Recife – Pernambuco.

HOUDE, A.; KADEMI, A.; LEBLANC, D. Lipases and their industrial applications: an overview. **Humana Press Inc. Applied Biochemistry and Biotechnology.** Jul-Sep 2004;118(1-3):155-70. doi: 10.1385/abab:118:1-3:155. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15304746/>>. Acesso em: 25 mar. 2021.

Instituto Adolfo Lutz. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 4ª ed., Ed. São Paulo: São Paulo, 2008.

ISMAIL, A. R.; BAEK, K. H. Lipase immobilization with support materials, preparation techniques, and applications: Present and future aspects. **International Journal of Biological Macromolecules** 163 (2020) 1624–1639.

JOHNER, J. C. F.; HATAMI, T.; MEIRELES, M. A. A. Developing a supercritical fluid method assisted by cold pressing for extraction of pequi (*Caryocar brasiliense*). **Journal of Supercritical Fluids**, Campinas, v. 137, n. December 2017, p. 34–39, 2018.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. V.; KRAHL, J.; RAMOS, L. P. **Manual de Biodiesel**. Editora Edgard Blücher Ltda. 1ª ed., 2006.

LICHSTON, J. E.; MOREIRA F. G. L. Potencialidade do nordeste brasileiro para a produção de biodiesel. **Congresso da rede brasileira de tecnologia de biodiesel**. Natal/RN, 22 a 25 de novembro de 2016. Disponível em: < <https://ubrabilio.com.br/2017/05/18/artigopotencialidade-do-nordeste-brasileiro-para-a-producao-de-biodiesel/>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

LIMA, J. R. et. al. **Óleo de amêndoa de pequi: obtenção, caracterização e avaliação de estabilidade durante armazenamento**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2019. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1109796/oleo-de-amendoa-de-pequi-obtencao-caracterizacao-e-avaliacao-de-estabilidade-durante-armazenamento>>. Acesso em: 21 mai. 2021.

LIMA, L. P. de. **Produção de ácidos graxos assistida por ultrassom visando à produção de biodiesel**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química, Fortaleza, 2010.

LIMA, P. C. R. **O biodiesel no brasil e no mundo e o potencial do estado da paraíba**. Biblioteca Digital – Câmara dos Deputados. Centro de Documentação e Informação. Coordenação de Biblioteca. Brasília, Maio de 2007. Disponível em: < <http://bd.camara.gov.br>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

LOBATO, A. K. C. L. Caracterização de misturas de óleos de mamona e soja visando a produção de biodiesel. **6º Congresso Brasileiro de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e**

Gás. Associação Brasileira de Pesquisa e Desenvolvimento em Petróleo e Gás (ABPG) Realização nos dias 9 a 13 de outubro de 2011. Universidade Federal de Santa Catarina.

LÔBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S. Biodiesel: parâmetro de qualidade e métodos analíticos. **Química nova**, v. 32, n. 6, 1596-1608, 2009.

LOSEKANN, L. et al. Impactos da crise sanitária da COVID-19 nos mercados de energia do Brasil. **Econômica – Niterói**, v. 22, n. 1, p. 31–57. Junho, 2020.

MACEDO, E. L. de. Transesterificação de triacilglicerídeos do óleo de pequi (*Cariocar brasiliense camb.*) para a produção de biodiesel via catálise heterogênea básica com catalisador sintetizado a partir de sílica, óxido de ferro magnético e iodeto de potássio. **14º Congresso Nacional de Iniciação Científica – CONIC-SEMESP.** Universidade Cidade de S. Paulo. São Paulo, 2014. Disponível em: < <http://conic-semesp.org.br/anais/files/2014/trabalho-1000018519.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2020.

MACHADO, S. A. **Produção de biodiesel a partir de óleo de macaúba com alta acidez empregando processo de hidroesterificação.** Tese (Doutorado). Ciências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Conversão de Biomassa) – Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 133f. 2017.

MAZO P. C.; RÍOS L. A. Esterificação e transesterificação assistida por microondas de óleo de palma bruto. Catálise homogênea. Pesquisa aplicada latino-americana. **Lat. Sou. apl. res.** Vol.40 n°4 Bahía Blanca out. 2010. Disponível em: < www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0327-07932010000400007&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.

MEDEIROS, P. R. M. da S. **Composição química e avaliação sensorial de biscoitos elaborados com polpa de pequi (*caryocar brasiliense camb.*) desidratada.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 2009.

MELLO, B. T. F de; FILHO, L. C; SILVA, C. de. Production of biodiesel from hydrosterification reaction. **Revista UNINGÁ Review**, Maringá, v. 35, eRUR3522, 2020. ISSN 2178-2571. doi.org/10.46311/2178-2571.35.eRUR3522. Ciências Exatas, da Terra e Engenharias.

Disponível em: < <https://library.douglascollege.ca/eds/detail?db=edsdoj&an=edsdoj.5afad24c65934eca92dc1ee9d898f925>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

MELO, C. D. DE. **Potencialidade do nordeste para o setor de biocombustível: revisão bibliográfica.** Monografia (graduação). Universidade Federal Do Rio Grande Do Norte Curso De Ecologia, Bacharelado. 40.f. Natal/RN 2016. Disponível em: < https://monografias.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/2111/1/PotencialidadeBiocombustivel_Melo_2016.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2021.

MELO, M. A. M. F. **Avaliação das propriedades de óleos vegetais visando a produção de biodiesel.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências Exatas e da Natureza. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. 118f. João Pessoa - PB. Outubro de 2010.

MIRANDA, L. P. **Compósitos reticulados de Eversa[®] Transform e nanopartículas magnéticas como biocatalisadores para a síntese de biodiesel em reator de fluxo em vórtices.** Tese (Doutorado). Universidade Federal de São Carlos. Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. São Carlos-SP, 2020.

MONTEIRO; R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Energy**, 2020.

NOVOZYMES, 2017. **The novozymes enzymatic biodiesel handbook.** Disponível em: <<http://www.novozymes.com/en/about-us/brochures>>. Acesso em: 20 jul. 2022.

OLIVEIRA, C. de J. de et al. Comparação da variação do índice de peróxido e massa específica das misturas de ésteres a partir do óleo de pequi após diferentes tempos de fritura. **R. gest. sust. ambient.** Florianópolis, n. esp, p.482-497, dez. 2015. Disponível em: <http://www.portaldeperiodicos.unisul.br/index.php/gestao_ambiental/article/view/3385>. Acesso em: 16 ago. 2020.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Quim. Nova.** Vol. 36, No. 1, 123-130, 2013. Disponível

em: < <https://www.scielo.br/j/qn/a/TGq5yqgBn6vsCxqJYHmnQsN/?lang=pt&format=pdf>>.
Acesso em: 22 dez. 2021.

OLIVEIRA, T. et al. Um estudo de matérias-primas para fabricação de biodiesel. **Educação, Gestão e Sociedade: revista da Faculdade Eça de Queirós**. ISSN 2179-9636, Ano 7, número 27, agosto de 2017. Disponível em: < <http://www.faceq.edu.br/regs>>. Acesso em: 18 mai. 2021.

OLIVEIRA, W. L. de. **Boas práticas de manejo para o extrativismo sustentável do pequi**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Brasília, 2010. 84 p.

ORTEGA, G. C. C.; MERCADO, E. R. A.; ARRIETA, B. M. C. Transesterificação de óleos vegetais usando catalisadores heterogêneos. **Prospectivo**. Vol.12 nº2 Barranquilla jul/dez. 2014. Disponível em: < www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-82612014000200010&lang=pt >. Acesso em: 29 set. 2020.

OSTER, V. V. **Influência do tempo de extração e da razão amostra: solvente no processo de extração do óleo do caroço do pequi visando a produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Tocantins, Programa de Pós-Graduação em Agroenergia, 2013.

PEDRO, K. C. N. R. **Avaliação da imobilização de preparações enzimáticas contendo lipases e seu emprego em reações de síntese de biodiesel**. Tese (Doutorado) - Universidade do estado do Rio de Janeiro, Instituto de Química. Rio de Janeiro/2018. 189f.

PEDRO, K. C. N. R. et al. Enzymatic fatty acid ethyl esters synthesis using acid soybean oil and liquid lipase formulation. **Chemical Engineering Communications**, DOI: 10.1080/00986445.2019.1572001.

PESSOA, A. S. **Extração do óleo da polpa de pequi (*Caryocar coriaceum*) utilizando propano subcrítico e cossolventes**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, SC, 2013. 105 p.

PINHOLT, C. et al. Influence of glycosylation on the adsorption of *Thermomyces lanuginosus* lipase to hydrophobic and hydrophilic surfaces. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 273–281, 2010.

PONTE, F. A. F. da. **Obtenção de bioquerosene a partir de resíduos dos óleos de babaçu e coco via catálise heterogênea**. Tese (doutorado). Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 168 f., Fortaleza-CE, 2017.

RAMOS, L. P. et al. Tecnologias de produção de biodiesel. **Rev. Virtual Quim.** Vol. 3, nº 5, 385-405, 2011. Disponível em: < <https://sistemas.eel.usp.br/docentes/arquivos/1285870/52/Tecnologiasdeproducaodebiodiesel.pdf>>. Acesso em: 29 set. 2020.

REMONATTO, D. **Síntese enzimática de ésteres de ácidos graxos a partir de diferentes matérias graxas utilizando as lipases Eversa Transform e Eversa Transform 2.0**. Tese (doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis-SC, 2017.

RIBEIRO, M. C. **Óleo de pequi: qualidade físico-química, teor de carotenoides e uso em animais com carência de vitamina A**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Lavras, 83 p. 2010.

RINALDI, R. et al. Síntese de biodiesel: uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Quim. Nova.** Vol. 30, nº 5, 1374-1380, 2007. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422007000500054&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.

ROCHA, Y. L. **Estudo da catálise enzimática para a produção de biodiesel a partir de óleo residual de andiroba (*carapa guianensis aubl.*)**. Dissertação (mestrado) da Universidade Federal do Amazonas. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação Programa de Pós-Graduação em Química. 113f. Manaus-AM, 2018.

RODRIGUES, R. C. **Síntese de biodiesel através da transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisada por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. Tese

(doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Departamento de Engenharia Química, Porto Alegre-RS, 2009.

RODRÍGUEZ, R. P. de et al. Conversão de subprodutos da indústria de óleos vegetais em biodiesel e sua utilização em motores de combustão interna: uma revisão. **Revista da Sociedade Brasileira de Química**. Vol. 31, nº 2, São Paulo abr./junho 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-66322014000200002&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.

ROSA, C. D. **Produção enzimática de biodiesel em modo contínuo em meio pressurizado**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e de Alimentos Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 136f. Florianópolis - SC. Julho de 2009.

SALIHU, A.; ALAN, Z. Solvent tolerant lipases: A review. **Process Biochemistry** 50 (2015) 86–96.

SANTIN, C. M. T. **Síntese de biodiesel pela transesterificação e esterificação enzimática em sistema livre de solvente em banho de ultrassom**. Tese (Doutorado). URI - Campus de Erechim. Departamento de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. 213f. Erechim, RS. Setembro de 2013.

SANTOS, F. S., et. al. A cultura do pequi (*Caryocar brasiliense Camb.*). **Revista Acta Iguazu, Cascavel**. V.2, n.3, p.46-57, 2013. ISSN: 2316-4093. Disponível em: <<https://e-revista.unioeste.br/index.php/actaiguazu/article/view/8620/6357>>. Acesso em: 29 set. 2020.

SANTOS, J. C. S. dos. **Estudo de parâmetros nas reações de síntese enzimática de biodiesel por intermédio de fluidos supercríticos**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará. Centro de Tecnologia. Departamento de Engenharia Química. 102 f. Fortaleza-CE, 2011.

SANTOS, A. F. dos et al. Avaliação físico-química de óleo bruto de polpa de pequi. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos, Campo Mourão (PR)**, v.1, n .2, p.111-115, jul./dez. 2010.

SATO, R. T., et al. Método Gc-Fid rápido para monitorar reações de transesterificação acídica e catalítica básica em óleos vegetais para preparação de biodiesel de metiléster. **Quim. Nova**. Vol.39, nº3, São Paulo, abr. 2016. Disponível em: < https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422016000300352&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.

SHELDON, R. A.; PELT, S. V. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, 2013, 42, 6223. DOI: 10.1039/c3cs60075k. View Article Online. View Journal. View Issue.

SILVA, J. A. B. da. **Produção de biodiesel e biolubrificantes: avaliação de novos catalisadores e antioxidantes naturais**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Instituto de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. 170.f. Natal-RN, 2019.

SILVA, M. A. **Processamento e caracterização de magnetita sintética**. Dissertação (mestrado). Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais. 96 f. Belo Horizonte, 2017.

SILVA, M.C.T.S.; et. al. Revestimentos utilizados em nanopartículas magnéticas para imobilização de enzimas: uma revisão. **Congresso Internacional da Agroindústria – CIAGRO**. 25 a 27 de setembro de 2020. Disponível em: < <https://ciagro.institutoidv.org/ciagro/uploads/980.pdf>>. Acesso em: 24 out. 2021.

SIMONELLI, G.; PIRES, C. A. M.; SANTOS, L. C. L. Análise da produção de biodiesel na região nordeste do Brasil. **9º Congresso brasileiro de pesquisa e desenvolvimento em petróleo e gás**. Maceió/AL, 09 a 11 de novembro de 2017. Disponível em: <http://www.portalabpg.org.br/site_portugues/anais/anais9/repositorio/trabalho/300510220820178397.pdf>. Acesso em: 18 mai. 2021.

SOUSA, F. das C. Uso do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*) do semiárido nordestino como substrato para a produção de biodiesel por catálise enzimática. **I Congresso Internacional da**

Diversidade do Semiárido – CONIDIS. Campina Grande-PB, 2016. Disponível em: <https://www.editorarealize.com.br/editora/anais/conidis/2016/TRAB_LHO_EV064_MD1_SA2_ID2684_24102016221835.pdf>. Acesso em: 29 set. 2020.

SOUZA, L. T. de A., et. al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte, p. 529 -568. **In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria** - Vol. 4. São Paulo: Blucher, 2017.

SOUZA, M. C. M. de. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres.** Tese (doutorado). Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. 87 f. Fortaleza, 2013.

SOUZA, M. C. M. de, et al. Production of flavor esters catalyzed by lipase B from *Candida Antarctica* immobilized on magnetic nanoparticles. **Braz J Chem Eng** 34:681–690 (2017). <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20170343s20150575>.

SOUZA, M. S. de. **Modelagem cinética da hidroxidação do ácido oleico empregando carbeto de molibdênio suportado em alumina.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal do Rio de Janeiro. COPP. Programa de Engenharia Química. Rio de Janeiro-RJ. 2019.

SOUZA, M. G. S. et al. Caracterização e utilização de óleo residual de pequi (*Caryocar brasiliense*) na Produção de Biocombustíveis Líquidos. **RIPE** 2019, 5, 2, 41-49.

SUN, S.; GUO, J.; CHEN, X. Biodiesel preparation from Semen *Abutilon theophrasti Medic.* seed oil using low-cost liquid lipase Eversa® transform 2.0 as a catalyst. **Industrial Crops & Products** 169 (2021) 113643. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2021.113643>.

VESCOVI, V. **Extração, purificação e imobilização de lipases vegetais destinadas à síntese de biodiesel e ésteres.** Dissertação (mestrado). Universidade Federal de São Carlos. 79 f. 2012.

VESCOVI, V. **Lipases imobilizadas em suportes híbridos como biocatalisadores para a produção de ésteres de açúcares.** Tese (doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos. 112 p. 2016.

VIEIRA et. al. Esterificação e transesterificação homogênea de óleos vegetais contendo alto teor de ácidos graxos livres. **Quim. Nova.** Vol. 41, No. 1, 10-16, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/stcV69RwbDBMnRCpYShkJny/?lang=pt>>. Acesso em: 29 set. 2020.

VILLADIEGO, M. M.; ROA, Y. O.; BENÍTEZ, L. T. Esterificação e transesterificação de óleos resíduos para obtenção de biodiesel. **Lua azul.** N° 40 Manizales Jan./June 2015. Disponível em: <www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1909-24742015000100003&lang=pt>. Acesso em: 29 set. 2020.