



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-
BRASILEIRA
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
CURSO DE ENGENHARIAS DE ENERGIAS**

CARLOS MANUEL PINTO DE SOUSA MARQUES

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS (BIODIESEL) A PARTIR
DO ÓLEO DE FRANGO RESIDUAL: UM ESTUDO DE COMBINAÇÃO DE
LIPASES**

REDENÇÃO - CE

2021

CARLOS MANUEL PINTO DE SOUSA MARQUES

**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS (BIODIESEL) A PARTIR
DO ÓLEO DE FRANGO RESIDUAL: UM ESTUDO DE COMBINAÇÃO DE
LIPASES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Orientador: Prof. José Cleiton Sousa dos Santos, Dr.

REDENÇÃO - CE

2021

**Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-
Brasileira Sistema de Bibliotecas da Unilab
Catalogação de Publicação na Fonte**

M316o

Marques, Carlos Manuel Pinto de Sousa.

Otimização da produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir do óleo de frango residual :
um estudo de combinação de lipases / Carlos Manuel Pinto de Sousa Marques. - 2021.

50 f. : il. color.

1. Biocombustíveis - Indústria. 2. Biodiesel. 3. Óleo residual de frango. I. Título.

BA/UF/BSCM

CDD 662.88

**Ficha catalográfica elaborada por Bruno Batista dos Anjos,
CRB-5/1693**

CARLOS MANUEL PINTO DE SOUSA MARQUES

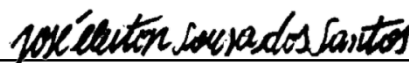
**OTIMIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESTERES ETÍLICOS (BIODIESEL) A PARTIR
DO ÓLEO DE FRANGO RESIDUAL: UM ESTUDO DE COMBINAÇÃO DE
LIPASES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de Engenharia de Energias da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira como requisito parcial à obtenção do título de Engenheiro de Energias.

Orientador: Prof. José Cleiton Sousa dos Santos, Dr. Coorientador:

Aprovado em: 09 / 04 / 2021

BANCA EXAMINADORA



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



Prof.^a Dra. Rita Karolinny Chaves de Lima - IEDS
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira



L.da Simone Cristina Freitas de Carvalho - IEDS
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira

A Deus,

A Minha família e amigos

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao Senhor meu Deus, todo poderoso por tudo. A minha Família, em especial a minha falecida mãe Mila, minha avó Judith, aos meus irmãos (Camila e Hermitério), aos meus tios (Lidia, Paulina, Nenita) e ao meu tio Paquito que me inspira e que se orgulhará dessa conquista.

Ao meu orientador José Cleiton Sousa dos Santos pela motivação, excelentíssima orientação e suporte, sem o qual não seria possível efetuar esse trabalho.

A todos os meus professores, que fizeram despertar em mim o interesse por suas matérias e ensinamentos.

Aos meus amigos e colegas de turma que compartilharam comigo momentos de aprendizados ao longo desses anos de formação.

A minha namorada Beatriz De Sousa Santos, por sempre ter me apoiado em todos os sentidos ao longo do curso, me aconselhando e ajudando nos momentos mais difíceis.

Ao meu grande amigo e parceiro de estudo Italo Rafael, alguém por quem tenho grande gratidão pela parceria e apoio durante a minha vida acadêmica na UNILAB.

Ao Brasil, país que foi receptivo de forma maravilhosa e que permite o ensino superior aos países em desenvolvimento e com poucos recursos como é o caso de São Tomé e Príncipe.

“A persistência é o caminho do êxito”

Charles Chaplin

RESUMO

Nos últimos anos vem crescendo a necessidade da humanidade de diminuir a emissão de gases do efeito estufa, Dentre os setores mais poluentes está o de transporte rodoviário, nesse contexto o biodiesel é uma alternativa para os combustíveis fósseis utilizados neste setor (óleo diesel, nominalmente), pois este biocombustível é de queima limpa, renovável, biodegradável e possui propriedades físico-químicas semelhantes ao diesel. No presente trabalho analisou-se a produção de biodiesel, através da esterificação de ácidos graxos livres (AGLs) extraídos do óleo de frango residual, ademais utilizou-se três lipases (lipase B de *Candida antarctica* (CALB), lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML)) para encontrar a melhor combinação para o substrato utilizado. Para tanto, foi empregado um planejamento triangular, de acordo com a análise estatística, o melhor biocatalisador para o substrato estudado é composto por 62,5 % de CALB e 37,5 % de RML. A combinação encontrada foi utilizada no planejamento Taguchi (L9), com o intuito de maximizar os parâmetros da reação (biocatalisador, razão molar, temperatura e tempo reacional). A maior conversão obtida no método do Taguchi foi de 91,20% com razão S/R de 39,20, sob condições otimizadas (10 % de biocatalisador, razão molar de 1:13, 45°C e 4,5 horas) obteve-se a conversão de 93,07%, semelhante a conversão teórica (94,5%). Dentre os parâmetros analisados o biocatalisador foi o que mais influenciou na reação, por outro lado o parâmetro de menor influência foi o tempo. Palavras-chave: Biodiesel. Biocatálise. Combi-lipases.

ABSTRACT

In recent years, humanity's need to reduce greenhouse gas emissions has been growing; the most polluted sector is road transport. In this case, biodiesel is an alternative to fossil fuel (diesel, nominally) used in the sector. Biofuel is clean, renewable, and biodegradable and has physical and chemical properties similar to diesel. In this work, biodiesel production was analysed by esterification of free fatty acids (AGLs) extracted from residual chicken oil. In addition, three lipases (*Candida Antarctica* lipase B (CALB), lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) and *Rhizomucor miehei* (RML) were used to find the best combination for the substrates used. Therefore, a triangular planning was used according to the statistical analysis, the best biocatalyst for the studied substrate is composed of 62,5% CALB and 37,5% RML. The combination found was used in Taguchi planning (L9), in order to maximise the parameters of the reaction (biocatalyst, molar ratio, temperature and reaction time). The highest conversion rate obtained by the Taguchi method is 91,20% with an S/R ratio of 39,20, which is the best under the conditions (10% biocatalyst, molar ratio of 1:13, 45°C and 4,5 hours), the conversion of 93,07% was obtained, similar to the theoretical conversion (94,5%). Among the parameters analyzed, the biocatalyst was the one that most influenced the reaction, on the other hand, the parameter with the least influence was time.

key-words: Biodiesel. Biocatalysis. combi-lipases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação do Biodiesel.....	14
Figura 2 - Evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil ...	15
Figura 3 - Perfil brasileiro das matérias primas consumidas na produção do biodiesel no ano 2018	16
Figura 4 - Reação reversível (esterificação/hidrólise) envolvendo um ácido graxo acompanhado de um álcool de cadeia curta, resultando na formação de éster e água.	20
Figura 5 - Superfície de resposta triangular para projeto experimental. Meio reacional: razão molar de 1:1 (AGLs/álcool) e teor de biocatalisador de 5% em massa de AGLs. As reações foram conduzidas a 30 °C por 1.5 horas a 200 rpm.	29
Figura 6 - Gráfico da razão S /N para esterificação de AGLs oriundos de óleo de frango.	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Especificações de qualidade do biodiesel.....	13
Tabela 2 - Teores dos ácidos graxos do óleo de frango residual.....	17
Tabela 3 - Fatores independentes e seus níveis de conversão para o Taguchi	26
Tabela 4 - Percentuais dos ácidos graxos na composição química do óleo de frango	Erro!
Indicador não definido.	
Tabela 5 - Níveis para os parâmetros analisados na síntese de biodiesel a partir de AGLs	28
Tabela 6 - Matriz de planejamento Taguchi L9 e seus respectivos valores de conversão e as relações S / R.	30
Tabela 7 - Resultados de ANOVA para parâmetros que afetam a conversão de éster. O efeito fatorial insignificante é agrupado conforme mostrado	31
Tabela 8 - Tabela de resposta de relações S/N. Mais detalhes são fornecidos na seção Materiais e Métodos.	32

LISTA DE SIGLAS

AGLs	Ácidos Graxos Livres
ANP	Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis
ASTM	<i>American Society para Teste e Materiais</i>
CALA	Lipase de <i>Candida antarctica</i> do Tipo A
CAL-B	Lipase de <i>Candida antarctica</i> do Tipo B
IEA	<i>International Energy Agency</i>
KDa	Quilo Dalton
PI	Ponto isoelétrico
PNPB	Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel
RML	<i>Rhizomucor miehei</i>
TLL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	11
2.1	Objetivo geral	11
2.2	Objetivos Específicos	11
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1	Energia e o uso de combustíveis fósseis	12
3.2	Biodiesel	12
3.3	Mercado Nacional de Biodiesel.....	15
3.4	Óleo de Frango Residual	17
3.5	Principais rotas de produção de biodiesel	19
3.6	Enzimas	20
3.7	Imobilização Enzimática	22
3.8	Planejamento Experimental.....	22
3.8.1	Planejamento triangular	23
3.8.2	Taguchi.....	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	Materiais	25
4.2	Hidrolise	25
4.3	Determinação da combinação do biocatalizador.....	25
4.4	Taguchi	26
5	RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Seleção da melhor combinação de lipase	28
5.2	Análise do Taguchi.....	30
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

A demanda energética apresenta rápido crescimento em decorrência, principalmente, do aumento populacional (HASANUZZAMAN et al., 2020). Grande parte do consumo de energia mundial é dependente de fontes energéticas não renováveis (GOLDEMBERG; MOREIRA, 2005), por exemplo, carvão mineral, gás natural e petróleo (STEEVES; OURIQUES, 2016). Contudo, essas fontes de energia estão diretamente relacionadas com diversos problemas globais, tais como: a intensificação do efeito estufa pela emissão de poluentes atmosféricos, mudanças climáticas e a manifestação de algumas doenças respiratórias (WUEBBLES; JAIN, 2001).

Os transportes rodoviários são os principais consumidores dessas fontes de energia, especialmente, com o uso do diesel (XUE et al., 2021). Esse combustível fóssil é produzido a partir da destilação do petróleo, podendo ser utilizado em motores de ônibus, caminhões, navios, dentre outros (COSTA et al., 2012). Nesse contexto, surge a necessidade de desenvolver combustíveis alternativos oriundos de fontes renováveis que agregam benefícios ambientais, econômicos e sociais, destacando-se os biocombustíveis, como o biodiesel e o etanol (TOKLU, 2017).

Dentre os biocombustíveis, o biodiesel é uma alternativa promissora como combustível para reduzir a dependência ao diesel, proteger o meio ambiente e diminuir o uso em excesso dos combustíveis fósseis (HUANG; ZHOU; LIN, 2012). Por ser de origem renovável, queima limpa, biodegradável (KALE; PATLE; KALAMBE, 2021) e poder ser aplicado em motores diesel sem exigência de alterações nos sistemas do motor, por apresentar características semelhantes às do diesel convencional (KNOTHE, 2010). O biodiesel é obtido a partir da esterificação de ácidos graxos ou transesterificação de triglicerídeos derivados de matérias-primas de origem renovável, a citar: gorduras animais e óleos vegetais (MEHER; VIDYASAGAR; NAIK, 2006).

No Brasil, a partir de janeiro 2005, o biodiesel começou a ser adicionado no diesel com um teor de 2% de forma voluntária, contudo em 2008 passou a ter caráter obrigatório e atualmente a adição do biodiesel no diesel é de 12% (B12) (CNPE, 2018). As principais matérias-primas empregadas para produção do biodiesel são: 67,75% do óleo de soja e 12,3% da gordura bovina, 11,67% de outros materiais graxos, 3,22% do óleo da palma e 5,06% de outras matérias primas (SCHIRMER; RIBEIRO, 2017). Apesar da soja ser a principal matéria-prima empregada na produção do biodiesel (PRUSZKO, 2020), a produção desse biocombustível a partir desta fonte comestível leva a competição por recursos energéticos e

alimentícios (MILAZZO et al., 2013). Nessa perspectiva, o óleo de frango residual surge como uma alternativa para produção do biodiesel por ser um recurso não comestível, além de possibilitar a redução do custo elevado da produção e garantir viabilidade econômica do processo (LIN; TSAI, 2015).

O Brasil é um dos maiores produtores de frango do mundo (FEHMBERGER et al., 2020). No entanto, o processo de abate de frangos gera resíduos como o óleo de frango e o seu descarte inadequado resulta na difusão de doenças e problemas ambientais referentes ao solo (LIN; TSAI, 2015). Além disso, o óleo de frango residual é composto principalmente por ácidos graxos insaturados, o que colabora positivamente para algumas propriedades físico-químicas do produto final do biodiesel, como índice de acidez, viscosidade cinemática e densidade (FOROUTAN; MOHAMMADI; RAMAVANDI, 2021).

O biodiesel pode ser produzido através da reação de transesterificação ou esterificação (COLOMBO; ENDER; BARROS, 2017). No entanto, a reação de transesterificação possui algumas desvantagens, como a formação de sabão e glicerol como subprodutos, o que torna necessário etapas adicionais de lavagem e purificação (BASUMATARY et al., 2021). A esterificação define-se como uma reação de um ácido graxo juntamente com um álcool de cadeia curta (etanol, por exemplo), na presença de um catalisador (enzimático ou químico) (SU, 2013). Os catalisadores enzimáticos apresentam inúmeras vantagens comparado com os químicos, a citar, as situações de reação mais brandas, viabilidade de reutilização do catalisador e a não produção de resíduos químicos ou sabões, contudo, apresenta algumas desvantagens, a citar, menor eficiência e maior tempo de reação (RAHIMPOUR, 2015).

Por possuir propriedades como alta especificidade, catalisar uma vasta diversidade de reações e elevada estabilidade sob diferentes condições e meios de reação, as lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são umas das enzimas mais empregadas (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019). A combinação das lipases *Candida antarctica* do Tipo B (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e *Rhizomucor miehei* (RML) visa ampliar o nível de especificidade do biocatalisador ao substrato, aumentando a taxa de conversão (POPPE et al., 2018). O planejamento experimental foi implementado na síntese de biodiesel por ser mais prático e barato, onde se utilizou o planejamento triangular para combinar as lipases de modo a obter a melhor combinação e em seguida o método do Taguchi para otimizar a produção de ésteres biodiesel de ácidos graxos livres a partir do óleo de frango residual, quanto as variáveis independentes (biocatalisador, razão molar, temperatura e tempo) (RAMOS et al., 2017; SHARMA et al., 2020).

Nesse contexto, objetivo desta comunicação foi avaliar a combinação de lipases (CALB, TLL e RML) para produção de ésteres etílicos (biodiesel) dos ácidos graxos do óleo de frango residual. Um planejamento de mistura de três fatores e análise de superfície triangular foi realizada, utilizando Statistica®. Uma vez que a melhor combinação foi determinada, um planejamento experimental Taguchi (L9) foi realizado de modo a determinar as condições ideais de reação (temperatura, conteúdo de biocatalisador, razão molar (ácido graxo livre (AGLs) / álcool) e tempo).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral desse trabalho é otimizar a produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir dos ácidos graxos obtidos do óleo de frango residual catalisado por uma combinação de lipases com o auxílio do planejamento experimental Taguchi.

2.2 Objetivos Específicos

- Coletar e tratar o óleo de frango bruto residual;
- Obter ácidos graxos a partir da matéria-prima estudada;
- Determinar a melhor combinação de biocatalizador para produção de ésteres etílicos (biodiesel) a partir do óleo de frango;
- Determinar e validar experimentalmente o ponto ótimo teórico (temperatura, razão molar, temperatura e tempo reacional) para a produção de ésteres etílicos (biodiesel) catalisado pela melhor combinação de lipase através do planejamento experimental Taguchi;
- Determinar quais parâmetros influenciam estatisticamente na reação.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Energia e o uso de combustíveis fósseis

O rápido crescimento da população, industrialização e urbanização ocasiona um aumento constante da demanda de energia (HARRIS et al., 2018; MAHLIA et al., 2020); os combustíveis fósseis (petróleo, carvão mineral, gás natural, por exemplo) são as principais fontes de energia do mundo (YESILYURT et al., 2020). Contudo, possuem reservas limitadas e emitem gases do efeito estufa (ABOMOHRRA et al., 2020; MARTINS; FELGUEIRAS; SMITKOVÁ, 2018), logo, são não-renováveis (KAHIA; AÏSSA; LANOUAR, 2017). Dentre os gases de efeito estufa emitidos na queima dos combustíveis fósseis, destaca-se o dióxido de carbono (CO₂) (CURTIN et al., 2019). Segundo a Agência Internacional de Energia (do inglês, *International Energy Agency – IEA*) a produção de CO₂ aumentou cerca de 32% entre os anos de 2000 a 2018 (IEA, 2020).

Esse crescimento dá-se pela expansão do setor de transporte, que com a utilização desses combustíveis é responsável por cerca de 64% das emissões antropogênicas de CO₂ (GUTIÉRREZ-ANTONIO et al., 2017). Diante do exposto, os transportes rodoviários são um dos principais emissores de gases de efeito estufa, por utilizar majoritariamente derivados do petróleo (diesel e gasolina) como combustível (NAVAS-ANGUITA; GARCÍA-GUSANO; IRIBARREN, 2019). De acordo com IEA, o consumo do diesel aumentou 6,8% para os carros de passageiros e 1,7% para os carros de carga, entre os anos 2000 a 2017 (IEA, 2020). O diesel é obtido por meio do fracionamento do petróleo em uma faixa de destilação entre 448 e 613 K (DEMIRBAS, 2008); composto por hidrocarbonetos (alcanos, nafteno, olefinas e aromáticos) que possuem entre 8 e 16 átomos de carbono (TUTAK et al., 2015), em menor quantidade algumas impurezas de nitrogênio, oxigênio e enxofre (FAYYAZBAKSH; PIROUZFAR, 2017).

Nesse contexto, cresceu nas últimas décadas o interesse por combustíveis para substituir o diesel, evitando assim os impactos ambientais, causado pela queima desse combustível. O biodiesel surge como alternativa, uma vez que é renovável, biodegradável, não inflamável, não tóxico e possui queima limpa (AMIN, 2019; MAHLIA et al., 2020; NISAR et al., 2017).

3.2 Biodiesel

O aumento do consumo mundial de energia, a maior dependência em combustíveis fósseis e os impactos ambientais, desencadearam a maior necessidade de utilização dos combustíveis de fontes renováveis, um exemplo é a incorporação do biodiesel nas linhas de motores a diesel (ARUN et al., 2021; ONG et al., 2021). Biodiesel é um grupo de ésteres

metflicos ou etflicos de ácidos graxos, geralmente derivados de óleos vegetais ou animais (MOSER, 2016; SINGH et al., 2020).

Biodiesel é biodegradável, produzido através de recursos renováveis, com queima limpa, não tóxico, possui teor médio de oxigênio em torno de 11%, neutro em carbono, praticamente isento de enxofre e de compostos aromáticos (VERTONHA; DELGADO; LUKASIEVICZ, 2018). Portanto, a utilização do biodiesel reduz a emissão de gases de efeito estufa; ademais, esse biocombustível é compatível com o diesel, podendo substituir esse combustível fóssil total ou parcialmente (MONTEIRO et al., 2020).

Com o intuito de certificar a segurança e a confiabilidade da operação do motor na utilização do biodiesel como combustível alternativo ao diesel, existem valores-limites específicos quanto as propriedades físico-químicas do mecanismo de combustão para garantir a qualidade e a composição consistente deste biocombustível (GIRARDI et al., 2021). No cenário internacional os principais padrões são definidos pela *Sociedade Americana para Teste e Materiais* (ASTM) (ASTM, 2020; YASIN et al., 2019).

Enquanto no Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP) por meio da Resolução ANP nº 45, de 25 de agosto de 2014, estabelece as especificações das propriedades físico-químicas do biodiesel (ANP, 2014). A Tabela 1 apresenta valores de propriedades biodiesel de acordo com a ANP nº 45 e a ASTM D6751.

Tabela 1— Especificações de qualidade do biodiesel

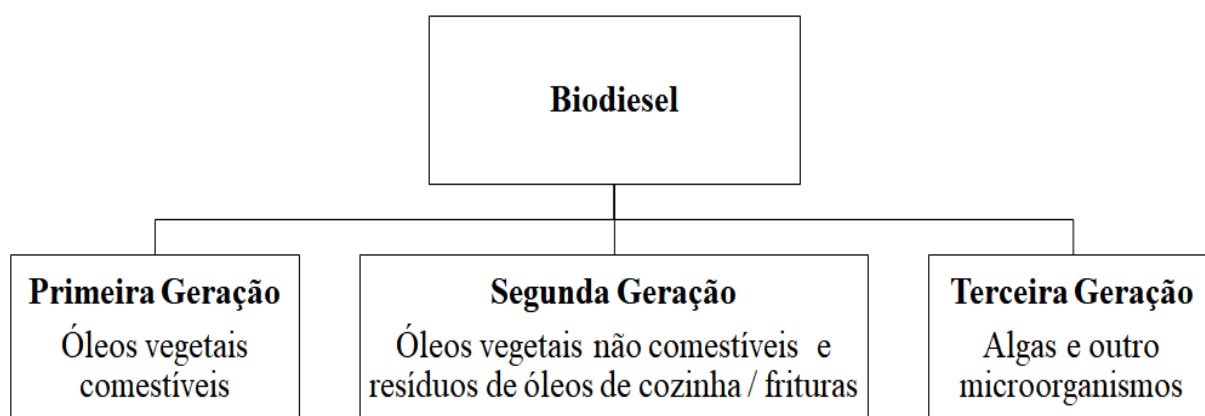
Características	Unidade	BRASIL/ANP N° 45	EUA/ ASTM D6751
Índice de acidez	Mg KOH/kg	0,5 máx.	0,5 máx.
Viscosidade cinemática (40°C)	mm ² /s		3,0 a 6,0
Densidade (20°C)	Kg/mm ³	Relatar	Relatar
Estabilidade oxidativa	H	3 min.	12 min.
Teor de água	mg/g	500 máx.	200 máx.
Glicerol livre	% massa	0,02 máx.	0,02 máx.
Glicerol total	% massa	0,24 máx.	0,25 máx.
Teor de água e sedimentos	% vol.	0,050 máx.	0,050 máx.
Ponto de fulgor	°C	130 min.	100 min.
Corrosividade	Taxa	Classe 3	Classe 1

Fonte: Elaborado pelo autor (adaptado de Silva, 2010; Brasil, 2014; Brasil 2019).

Um dos fatores de maior relevância nas propriedades do biodiesel é a fonte de AGLs, por exemplo, o óleo de babaçu possui na sua constituição química triacilgliceróis formados por ácidos graxos saturados com 12, 14 e 16 átomos de carbonos, láurico, mirístico e palmítico respectivamente (MOREIRA et al., 2020). Graças a abundância em AGLs saturados do óleo de babaçu, o biodiesel produzido a partir desse óleo apresenta boa estabilidade térmica e oxidativa (BAUER et al., 2020).

A **Figura 1** demonstra a classificação do biodiesel quanto a fonte de AGLs, que são classificados em três gerações: 1ª geração derivada de óleos vegetais comestíveis; 2ª geração de óleos vegetais não comestíveis e resíduos de óleo de cozinha / fritura; e a 3ª geração de algas e alguns microrganismos (NORJANNAH et al., 2016). Nos últimos anos vem crescendo o interesse de produzir biodiesel através de fontes não alimentícias (2ª e 3ª geração), pois além de evitar concorrência com o mercado alimentício, é possível produzir um produto com valor agregado a partir de um material que seria descartado (FRANCO et al., 2013).

Figura 1 — Classificação do Biodiesel



Fonte: Elaborado pelo autor (NORJANNAH et al., 2016).

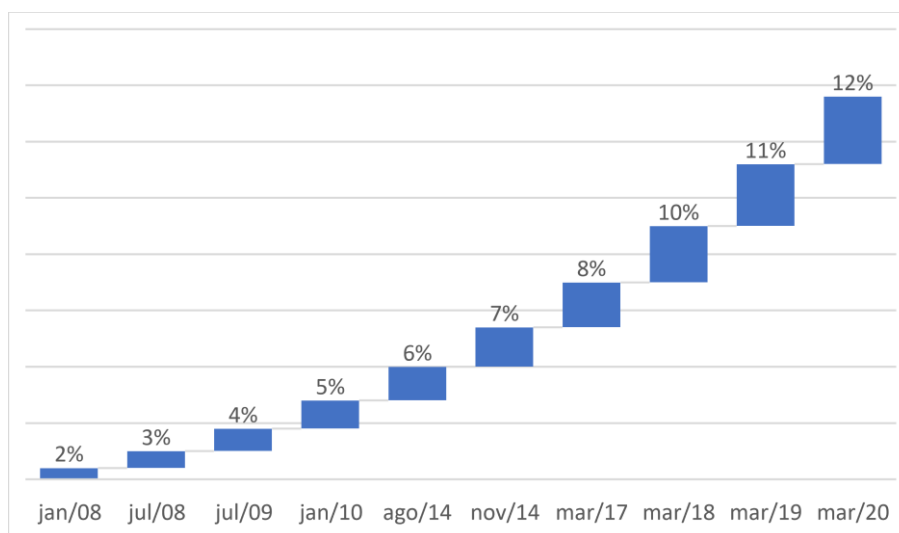
A principal matéria-prima para a síntese de biodiesel no Brasil é o óleo de soja (YASIN et al., 2019). No Brasil, a soja é empregada em larga escala no setor alimentício, por exemplo, na produção dos óleos e bebidas (leite, sucos), mas a principal destinação desse grão é a exportação com a finalidade de servir como ração animal (DARMAJANA; AFIFAH; INDRIATI, 2020; SOENDERGAARD, 2018). O óleo de soja é o mais utilizado na produção do biodiesel em função da evolução tecnológica para a expansão do cultivo da soja, além de possuir uma cadeia produtiva bem estruturada com retorno do plantio rápido entre 4 e 5 meses (PAULILLO et al., 2007).

Na próxima seção será abordado um breve histórico do mercado nacional do biodiesel brasileiro, as principais leis relacionadas ao tema assim como as principais fontes de AGLs utilizadas no país.

3.3 Mercado Nacional de Biodiesel

O Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), foi lançado em dezembro de 2004 pelo governo federal com o intuito inicial de introduzir o biodiesel na matriz energética brasileira em caráter experimental e a partir dos anos 2005 a 2007, a comercialização passou a ser voluntário no teor de 2% (EM, 2011). O artigo 2 da Lei n 11.097 / 2005 descreve a introdução do uso obrigatório do biodiesel na matriz energética brasileira (AMBIENTE, 2019). Em janeiro de 2008, entrou em vigor a mistura legalmente obrigatória em todo território nacional, mas com o amadurecimento do mercado, esse percentual foi aumentado diversas vezes pelo Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) até o atual percentual de 12% (AMARAL; ABREU, 2016). A **Figura 2** apresenta a evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil.

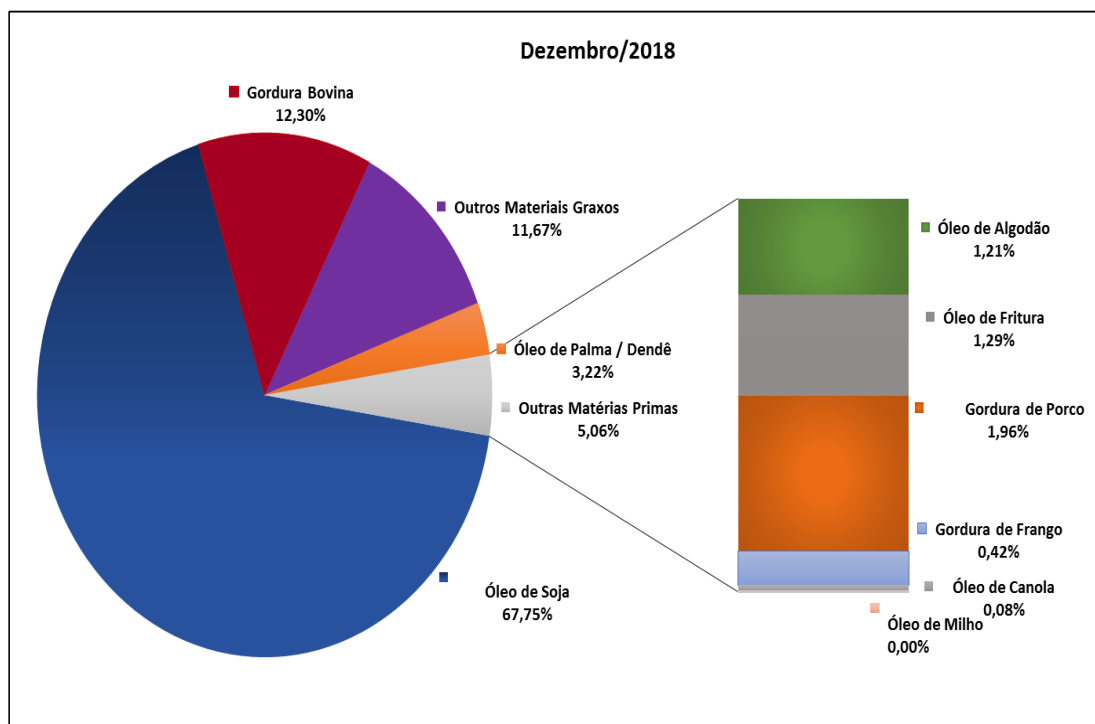
Figura 2 - Evolução do percentual de teor de biodiesel presente no diesel fóssil no Brasil



Fonte: Adaptado pelo autor (ANP, 2019).

Como pode-se observar no gráfico, em 2020 a adição do biodiesel no diesel foi de 12% (B12), com previsão de aumento gradual para cerca de 15% (B15) até 2023 para o consumidor final (ANP, 2016). Nesse contexto, há 11 plantas trabalhando na expansão da produção, dez novas unidades em construção e prevê-se que a produção do biodiesel aumente de 5,4 para mais de 10 bilhões de litros anuais, o que representa um aumento de 85% da demanda doméstica (MASIERO, 2011).

O Brasil é um país que, por sua extensa área geográfica, clima subtropical e recursos hídricos, apresenta amplas diversidades oleaginosas que podem ser utilizadas para produção de biodiesel (YESILYURT et al., 2020). Destacam-se, entre elas, o algodão, o amendoim, a soja e o girassol (RAMOS et al., 2017). Também é considerada matéria-prima para produção do biodiesel as gorduras animais e óleos já utilizados na fritura dos alimentos (GHOSH, 2016).

Figura 3 - Perfil brasileiro das matérias primas consumidas na produção do biodiesel no ano 2018

Fonte: ANP, conforme Resolução ANP nº 734/2018.

Como pode ser observado na **Figura 3**, as principais matérias-primas utilizadas para produção do biodiesel são a soja com 67,75%, seguida da gordura bovina com 12,30% e de outros materiais graxos com 11,67%.

Justifica-se o fato da soja ser a fonte mais utilizada para produção de biodiesel, pois seu cultivo possui uma cadeia produtiva consolidada (MACHADO et al., 2017). Outra vantagem da utilização da soja para a produção de biodiesel é que esta oleaginosa não é produzida apenas para obter o óleo, sendo sua produção consequência da demanda de farelo proteico, que é utilizado para ração animal de frango, porco e o bovino confinado produtores de carne, de ovos e de leite, cuja demanda aumenta constantemente, devido ao crescimento da economia e da renda per capita, principalmente dos países emergentes (DALL'AGNOL, 2007).

Contudo, faz-se necessário encontrar novas fontes para diversificar a produção de biodiesel, pois o emprego da soja para esse fim gera uma disputa entre o setor energético e o alimentício (MASIERO; LOPES, 2008), ademais essa oleaginosa apresenta baixa capacidade de armazenamento de óleo e menor estabilidade à oxidação quando comparada com outras oleaginosas, a citar, mamona, girassol, pinhão manso e macaúba (BISCHOFF et al., 2016).

Nesse contexto, é válido destacar que o Brasil é o terceiro maior produtor de frango no mundo, gerando mais de 2 mil toneladas de resíduos por ano através da indústria avícola,

portanto o óleo de frango residual é uma opção promissora para a produção deste biocombustível (EMBRAPA, 2020; KADIR YESILYURT; CESUR, 2020).

3.4 Óleo de Frango Residual

A crescente demanda por carne de frango e seus derivados faz da atividade avícola uma das indústrias que mais cresce no Brasil (EMBRAPA, 2020). A produção nacional de frangos para corte concentra-se principalmente na região Sul e Sudeste do Brasil (SCHMIDT; SILVA, 2018). Nesse contexto, uma questão que deve ser levada em consideração é um destino adequado para os resíduos produzidos no processo de abate, uma vez que o descarte incorreto de resíduos como óleo de frango, pode resultar na contaminação de lençóis freáticos e do solo, e difusão de doenças, fortalecendo um grande incentivo para produção do biodiesel (LÓPEZ-ANDRÉS et al., 2018).

Portanto, a produção de biodiesel através de óleo de frango residual é positiva por evitar o descarte inadequado desse resíduo – preservando o meio ambiente – e gerar um produto com valor agregado (biodiesel) (ALPTEKIN; CANAKCI, 2010; BORTOLETO et al., 2018).

O óleo de frango residual apresenta-se como um substrato heterogêneo, com composição de até 70% de triglicerídeos formados por diferentes ácidos graxos como: oleico, palmítico e linoleico (KAJASTE, 2014; SHOBHANA-GNANASERKHAR et al., 2020). Na **Tabela 2**, são apresentados os teores dos ácidos graxos do óleo residual de frango de dois estudos reportados na literatura.

Tabela 2 - Teores dos ácidos graxos do óleo de frango residual

Ácidos Graxos	Fórmula Molecular	Símbolo	Massa molar (g/mol)	(CHIU; GRIMALDI; GIOIELLI, 2007)	(KIRUBAKARAN; ARUL MOZHI SELVAN, 2018)
Palmítico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	C16:0	256,41	24,71	24,52
Palmitoléico	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	C16:1	254,43	7,13	4,83
Estearíco	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	C18:0	284,52	6,62	5,82
Oléico	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	C18:1	282,51	43,41	39,83
Linoléico	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	C18:2	280,43	17,23	20,52
α-linoleico	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	C18:3	278,42	1,01	2,14
			ΣSAT	31,92	31,85
			ΣMON	50,52	50,34
			ΣPOL	18,22	18,02

SAT = Ácido graxo saturado; MON = ácido graxo monoinsaturado; POL = ácido graxo poli-insaturado; Fonte:

Elaborado pelo autor (adaptado de Chiu, 2007; Kirubakaran, 2018).

Como pode ser observado na **Tabela 2**, ambos estudos apresentam valores semelhantes para a composição de AGLs do óleo de frango residual. As pequenas variações nos resultados são devidas a origem distintas dos óleos analisados em cada estudo. De acordo com a **Tabela 2**, o óleo de frango é composto aproximadamente por 68% de AGLs insaturados, com destaque para o ácido oleico (cerca de 40%) e o linoleico (cerca de 20%) (KIRUBAKARAN; ARUL MOZHI SELVAN, 2018). Já os ácidos saturados representam aproximadamente 32% da composição do óleo de frango, com destaque para os ácidos palmítico (25 %) e esteárico (6 %) (CHIU; GRIMALDI; GIOIELLI, 2007). De acordo com os estudos apresentados na tabela os valores da massa molar do óleo de frango residual são: 274,10 g/mol (CHIU; GRIMALDI; GIOIELLI, 2007) e 267,73 g/mol (KIRUBAKARAN; ARUL MOZHI SELVAN, 2018).

Os teores de ácido graxo livre, apresentados acima, assim como outras propriedades do óleo produzido a partir de resíduos de pele de frango, colaboram para a produção de um biodiesel com ótimas propriedades físico-químicas (RAMOS et al., 2017). O valor calorífico líquido do óleo de frango é em torno de 37,91 MJ /Kg, ligeiramente menor aos combustíveis de petróleo, além disso, parâmetros como número de cetano e densidade do biodiesel do óleo de frango são semelhantes aos padrões de biodiesel ASTM D6751 (BEHÇET et al., 2015).

Ademais, o biodiesel produzido a partir do óleo de frango tende a possuir maior estabilidade oxidativa, dado que os compostos insaturados contêm moléculas com duplas ligações reativas ao iodo, tornando as moléculas de gordura menos estáveis e mais suscetíveis à oxidação (KIRUBAKARAN; ARUL MOZHI SELVAN, 2018). Ao comparar-se as viscosidades cinemáticas do biodiesel produzido por óleo de frango residual com a do óleo diesel de petróleo (entre 2,0 e 4,0 mm²/s), os autores verificaram valores próximos, podendo o biodiesel de frango ser adicionado ao óleo diesel sem maiores implicações para os motores do ciclo diesel, no que diz respeito à viscosidade (VERTONHA; DELGADO; LUKASIEVICZ, 2018). Este parâmetro é muito valioso ao trabalhar com biocombustíveis líquidos porque está fortemente relacionado com a capacidade que o fluido terá de fluir no sistema (JUBILUT, 2010).

Nessa conjuntura, o óleo de frango residual se apresenta como uma alternativa promissora para a produção de biodiesel, pois, evita o descarte inadequado desse óleo, não poluindo o meio ambiente, ocorre um ganho econômico, visto que um produto que seria descartado será utilizado na produção de um biocombustível, além disso, o biodiesel produzido possuirá excelentes propriedades. Na próxima seção será apresentado as vantagens e desvantagens das principais rotas de produção de biodiesel.

3.5 Principais rotas de produção de biodiesel

A transesterificação é a reação entre óleos vegetais ou gorduras de animais (triglicerídeos) e um álcool de cadeia curta, normalmente em excesso a fim de deslocar o equilíbrio da reação para formação dos produtos, acompanhado de um catalizador, químico ou enzimático, obtendo como produto principal um éster e como coproduto a glicerina (QUADER; AHMED, 2017).

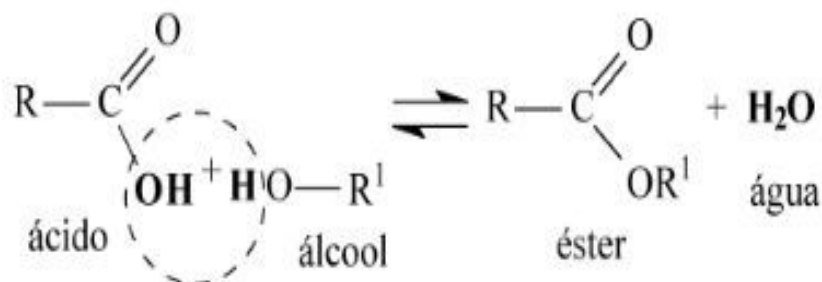
A transesterificação via catálise básica é a rota tradicional de produção do biodiesel (VARGAS; LISSNER; METH, 2017), a principal vantagem desse processo é o curto tempo requerido e sua alta eficiência (BASUMATARY et al., 2021); contudo, possui também algumas desvantagens, como a necessidade de altas temperaturas, o óleo a ser utilizado deve possuir baixa teor de água e ser livre de AGLs para evitar a inativação dos catalisadores, além disso, a formação de sabão e glicerol torna necessário as etapas de lavagem e purificação, causando um encarecimento do processo (MONTEIRO et al., 2021; RATHORE; NEWALKAR; BADONI, 2016).

Esses problemas podem ser superados através da esterificação dos AGLs, além do biodiesel, apenas água é gerada como sub produto nesse processo (DABDOUB; BRONZEL; RAMPIN, 2009). A esterificação é amplamente empregada em diversas indústrias, dentre elas: químicas, alimentícias e petroquímica (ALVAREZ SERAFINI; TONETTO, 2019).

A reação de esterificação para a produção do biodiesel ocorre a partir da reação do ácido graxo com um álcool de cadeia curta (metanol ou etanol) e um catalisador obtendo éster e água como subproduto (POURZOLFAGHAR et al., 2016). Além de não produzir glicerol (evitando etapas de lavagem, purificação e problemas relacionados ao descarte desse coproduto), a esterificação atinge altas taxas de conversão com óleo com altos valores de acidez, favorecendo a produção de biodiesel através de óleos que não competem com a indústria alimentícia (KOHLHEPP, 2010).

A esterificação é uma reação reversível (**Figura 4**), em que o catalisador age tanto na reação direta (esterificação) quanto na indireta (hidrólise do éster), então, para deslocar o equilíbrio para a formação dos produtos é necessário que o álcool esteja em excesso (ALMEIDA, 2016; KARIM et al., 2020).

Figura 4 - Reação reversível (esterificação/hidrólise) envolvendo um ácido graxo acompanhado de um álcool de cadeia curta, resultando na formação de éster e água.



Fonte: Adaptado pelo autor (ALMEIDA, 2016).

3.6 Enzimas

Embora os catalisadores químicos possuam alta eficiência e curtos períodos de reação (FONSECA et al., 2019; ZHONG et al., 2020), eles apresentam diversas desvantagens, tais como: alto consumo de energia, corrosão de equipamentos, difícil recuperação e posterior reuso do catalisador e produção de subprodutos indesejáveis (sabão e glicerol, por exemplo), o que reduz consideravelmente o rendimento da reação e aumenta o custo de produção devido à necessidade de processos adicionais de purificação do produto (CHOWDHURY et al., 2014; MOAZENI; CHEN; ZHANG, 2019; PATCHIMPET et al., 2020).

Derivadas a partir de recursos renováveis como plantas, animais e microrganismos, as enzimas, são biocatalisadores de natureza proteica (PENG et al., 2019), responsáveis por catalisar reações químicas e bioquímicas mais complexas, nas condições experimentais e ambientais mais benignas (MOREIRA et al., 2020). A aplicação das enzimas como biocatalisadores vem se mostrando uma alternativa promissora aos catalisadores químicos, uma vez que, performam sob condições brandas de reação (temperatura, pressão, agitação e pH), o que resulta em uma economia de energia, ademais os processos catalisados por enzimas não requerem etapas de purificação dado que a sua alta especificidade e seletividade evita a produção de coprodutos indesejados (MITTERSTEINER et al., 2016). Embora as enzimas sejam mais caras, tem mais tempo de reação e menos eficiência que os catalisadores químicos, a imobilização facilita a recuperação e reutilização das enzimas (REIS et al., 2019).

O avanço das tecnologias e técnicas enzimáticas promove a obtenção de produtos com alto valor e têm sido empregadas em inúmeras aplicações, por exemplo, na indústria química (cosméticos, farmacêutica), têxteis, biocombustíveis, alimentícia e bebidas (LI et al., 2012).

As lipases (triacilglicerol hidrolases, EC 3.1.1.3) são as enzimas mais empregadas em biocatálise (BARROS; FLEURI; MACEDO, 2010), podendo catalisar diversas reações, a citar: transesterificação, hidrólise, esterificação, acidólise e aminólise (GONÇALVES et al.,

2019). Por serem detentoras de alta especificidade de substrato, alta estabilidade sob várias condições e meios de reações (aquosos, solventes orgânicos e solventes modernos) e a não demandarem o uso de cofatores (PEREZ et al., 2014), as lipases são muito utilizadas em diversas aplicações industriais, englobando produção de biolubrificante, produtos farmacêuticos, tratamentos de águas residuais, síntese de biocombustíveis, dentre outros (ANOBOM et al., 2014). Ademais, existem técnicas como modificação físico-química (ZOU et al., 2020), manipulação genética e imobilização (PINHEIRO et al., 2019) que modulam a seletividade, especificidade e atividades das lipases (CORTEZ; DE CASTRO; ANDRADE, 2016).

A levedura basidiomicética *Candida antarctica*, produz dois tipos diferentes de lipases: lipase A de *Candida antarctica* (CALA) e lipase B de *Candida antarctica* (CALB). A CALB é composta por massa molar de 33KDa (QuiloDalton), 317 resíduos de aminoácidos e ponto isoelétrico (PI) 6 (RABBANI et al., 2015). É comercializada na forma imobilizada em uma resina acrílica macroporosa CALB (Novozym® 435) e solúvel (6,55 mg/mL), ambas vendidas pela Novozymes (HÖCK et al., 2018). Por possuir propriedades como: uma ampla gama de especificidade para substratos, elevada atividade para várias reações diferentes, sob condições brandas, resistência a solventes orgânicos, elevada estabilidade térmica e de pH e estereoespecificidade (BASSO; SERBAN, 2019), a CALB tem sido empregada em diferentes setores da indústria, por exemplo, fármacos, alimentos e bebidas, detergentes e cosméticos (MONTEIRO et al., 2020).

A Lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) é uma lipase proveniente de microrganismos termófilos, comercializada na forma livre (*Lipolase*®) e na forma imobilizada (*Lipozyme TL IM*®) (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). É uma proteína de cadeia única que consiste em 269 aminoácidos, massa molar de 31,7KDa e PI de 4,4 (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Além de apresentar uma alta estabilidade em uma ampla faixa de pH (entre 7 e 10), possui aplicação em várias áreas industriais, como na produção de fármacos e de detergentes (RAJENDRAN; PALANISAMY; THANGAVELU, 2009).

A Lipase *Rhizomucor miehei* (RML) é uma proteína extracelular de origem fúngica, comercializada na forma solúvel (*Palatase 2000 L*) e imobilizada (*Lipozyme RM IM*). Constituída por 269 aminoácidos, uma massa molar de 29 kDa e um PI de 3,8 (GARMROODI et al., 2016). A RML possui atividade muito alta e boa estabilidade sob diversas condições experimentais (solventes orgânicos anidros, fluidos supercríticos, etc) (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Essa enzima é aplicada na indústria alimentícia, química orgânica e na produção de biocombustíveis (CALERO et al., 2019; ZHONG et al., 2019).

3.7 Imobilização Enzimática

O uso de enzimas na forma solúvel ou livre evidencia alguns dos problemas associados à baixa estabilidade operacional desses biocatalisadores e à dificuldade de reciclagem e posterior reaproveitamento (REIS et al., 2019). No entanto, existem técnicas de imobilização apropriadas que podem facilitar a recuperação do biocatalisador, eliminando ou minimizando a contaminação pelo produto e, assim, reduzindo os custos associados com uso de enzimas (TORRES et al., 2018). Além disso, a imobilização de enzima, produz um biocatalisador maior resistência a variações de pH, temperatura, melhor estabilidade operacional e armazenamento (ZHOU; ZHANG; CAI, 2021). Essas técnicas de imobilização equivalem no aprisionamento da enzima em um suporte sólido insolúvel e, conseqüentemente, permitem a aplicação das lipases em processos industriais, como: têxtil, bioenergia, alimentícia e de bebidas, dentre outras (CAVALCANTE et al., 2020).

Geralmente, as enzimas são imobilizadas por métodos de ligação covalente, aprisionamento, adsorção, reticulação e encapsulando, sendo classificadas como físico ou químico, dependendo da interação entre a enzima e o método de suporte (FERNANDES; LIMA; LOPES, 2010). A adsorção e o aprisionamento são considerados como técnicas físicas, tendo em conta que não há formações de ligações covalentes entre eles, enquanto que a reticulação e a ligação covalente são métodos químicos, uma vez que as enzimas são imobilizadas por ligações covalentes (MONTEIRO et al., 2019).

O método de ligação covalente é um dos métodos mais empregados para alcançar a imobilização enzimática, ocorre por meio de reações químicas entre o material do suporte sólido e o lado da enzima que contém cadeias de aminoácidos (lisina, cisteína, por exemplo, ou resíduos de ácido aspártico e ácido glutâmico) (SANTOS et al., 2015). A ligação covalente é estável, o que evita que a enzima se decomponha do suporte, aumentando assim a estabilidade da enzima imobilizada (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

Em comparação com as enzimas solúveis, as vantagens das enzimas imobilizadas são: possibilidade de reutilização do biocatalisador; facilidade de separação do catalisador e do produto da reação e de interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão; além da possibilidade de conduzir processos contínuo (SOUZA et al., 2017).

3.8 Planejamento Experimental

As metodologias estatísticas de planejamento experimental surgiram com objetivo de substituir a metodologia clássica, que é caracterizada pela mudança de uma variável de cada vez mantendo as outras constantes, o que demanda diversos conjuntos de dados experimentais, apresenta pouca interação entre as variáveis do processo e difere das metodologias estatísticas

do planejamento experimental pois estas aceitam a interação de variáveis independente para obter o melhor fator dependente com um número menor de observações (LÚCIO; SARI, 2017).

3.8.1 Planejamento triangular

O planejamento triangular ou planejamento de misturas é uma variação da Metodologia de Superfície de Resposta, neste planejamento as variáveis independentes são misturadas e afetam a variável dependente de acordo com a proporção de cada variável independente, desse modo obtém-se a proporção de cada variável independente que vai otimizar a reação em estudo (BURUK SAHIN; AKTAR DEMIRTAŞ; BURNAK, 2016). Por exemplo, em um estudo com combi-lipase três enzimas são misturadas em proporções diferentes (**Tabela 4**), através de uma análise estatísticas dos resultados é possível obter a melhor combinação de lipases, ou seja, as lipases e suas respectivas porcentagens que iram resultar na maior conversão.

Nos últimos anos o planejamento triangular vem sendo aplicado tanto em reações de hidrólise (RAMOS et al., 2015), quanto esterificação (FERREIRA; LEMOS CARDOSO; DA SILVA, 2012) catalisadas por lipases. Determinar a melhor combinação de lipases para um determinado substrato otimiza o processo, pois embora a especificidade das lipases seja uma propriedade positiva uma vez que evita a produção de coprodutos para substratos complexos (triglicerídeos e AGLs, por exemplo) a especificidade pode fazer com que a lipase catalise apenas uma parcela do substrato, resultando em baixas conversões; ao misturar lipases de diferentes especificidades e régio-especificidades é possível obter um biocatalisador com maior afinidade para o substrato utilizado (ROCHA et al., 2020).

3.8.2 Taguchi

A técnica Taguchi é uma ferramenta poderosa que possibilita projetar experimentos com baixo número de execuções para otimizar os parâmetros reacionais e obter informações sobre o sistema (LEKAN et al., 2020). Surgiu com o objetivo de adicionar uma nova abordagem aquela puramente estatística que foi utilizada durante anos por projetistas de experimentos (GAITONDE; KARNIK; DAVIM, 2015). Desta forma, Genichi Taguchi recomendou a redução em grande número de experimentos com aplicação de matrizes ortogonais e tabelas triangulares de sua autoria, sendo complementado com a definição de função perda, projeto por parâmetros, tolerâncias e a medida estatística de desempenho chamada de razão sinal-ruído (S / R) (DHAWANE et al., 2018).

Neste processo, a matriz ortogonal (OA) demanda um agrupamento de experimentos bem equilibrados (execuções experimentais mínimas), os parâmetros principais estão localizados em diferentes linhas da OA planejada (MOHAMED et al., 2018). É válido destacar que a razão S / R são funções logarítmicas da saída desejada para servir como funções

objetivas para otimização e a sua proporção depende das características de qualidade do produto/processo a ser otimizado (MITAL et al., 2014). Desta forma, por considerar diversos parâmetros de entrada ao mesmo tempo (demandando menos pontos reacionais) a técnica de Taguchi reduz custo com reagentes e diminui o tempo de entrega do produto desejado (SAHOO, 2012).

Taguchi é composto por duas análises, a razão S/R é calculada a partir da conversão obtida (Equação 3), indica os níveis das variáveis de entrada que iram otimizar a reação, enquanto a análise de variação (ANOVA) é empregada para determinar quais parâmetros são estatisticamente significativos na reação (KARMAKAR; DHAWANE; HALDER, 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As lipases (E.C. 3.1.1.3) comerciais imobilizadas *Candida antarctica* (CALB), *Thermomyces lanuginosus* (TLL), e *Rhizomucor miehei* (RML), foram gentilmente doadas pela Novozymes A/S (Espanha). O álcool utilizado foi o etanol (P.A 99,96%) da Dinâmica (São Paulo, Brasil), o óleo de frango, foi coletado em fornos elétricos em um mercado localizado na cidade de Redenção-CE, Brasil. Para a elaboração do planejamento experimental do tipo Taguchi foi utilizado o software STATISTICA® da StatSoft® versão 10.0. Para criação de tabelas e gráficos foi utilizado o Microsoft Excel 2016 da Microsoft®. Os demais reagentes de grau analítico foram adquiridos da Synth (São Paulo, Brasil) e da Vetec (São Paulo, Brasil).

4.2 Hidrólise

A produção de ácidos graxos livres (AGLs) a partir do óleo de frango residual seguiu a metodologia relatada por (Lima et al., 2012), com algumas modificações. Resumidamente, a hidrólise alcalina foi realizada em banho ultrassônico (Unique Inc., modelo USC 2800A), operando a 37 kHz, 300 W e 60° C por 60 minutos, adicionando 100 g de óleo de frango e 200 mL de solução etanoica de KOH (10:1 etanol / KOH). Então a hidrólise ácida foi realizada pela adição de uma solução de H₂SO₄ (27% p / p) até a mistura atingir pH 4,0. Finalmente, a mistura foi deixada em repouso para separação de fases por 2 horas. A fase superior (AGLs) foi lavada com água destilada a 80 °C até a água de lavagem atingir a neutralidade.

4.3 Determinação da combinação do biocatalizador

A fim de determinar a melhor combinação lipase (TLL, CALB e RML) para a produção de um éster biodiesel dos ácidos graxos do óleo de frango residual, um planejamento de mistura de três fatores e análise de superfície triangular foi realizada, utilizando software STATISTICA® da StatSoft® versão 10.0. Para a produção do éster biodiesel, foi considerada uma razão molar de 1:1 (AGLs / álcool) e uma massa do biocatalisador de 5% dos ácidos graxos livres. As reações foram conduzidas em incubadora de agitador orbital 200 rpm a 30 ° C por 1,5 horas. Após o tempo de reação específico, foi determinado o índice de acidez para cada amostra. Para tanto, alíquotas de 0,2 g foram retiradas do volume da reação, diluídas em 5 mL de álcool etílico e 3 gotas de fenolftaleína e posteriormente tituladas com hidróxido de sódio (0,1M) (CAVALCANTI et al., 2018), com algumas modificações. O índice de acidez (IA) foi estabelecido de acordo com a Equação 1.

$$IA \text{ (mgNaOH/g)} = MM_{\text{NaOH}} \times III_{\text{NaOH}} \times f \times (V_{\text{NaOH}}/m) \quad (1)$$

Em que, MM_{NaOH} (g / mol) é a massa molar de NaOH; M_{NaOH} (mol / L) é a molaridade da solução de NaOH; f é o fator de correção determinado pela padronização de NaOH; V_{NaOH} (mL) é o volume de NaOH gasto na titulação; e, m (g) é a massa da amostra a ser analisada. A conversão de ácidos graxos livres em ésteres foi calculada pela Equação 2, considerando a acidez no tempo zero (AI_0) e no tempo t (AI_t).

$$\text{Conversão AGLs(\%)} = (AI_0 - AI_t)/AI_0 \times 100 \quad (2)$$

4.4 Taguchi

Para este estudo, um projeto experimental avançado pelo método de Taguchi com uma matriz ortogonal padrão L9 (o "L" e "9" representam o quadrado latino e o número de experimentos, respectivamente) foi utilizado para examinar quatro fatores em três níveis em ordem para otimizar a produção de ésteres biodiesel de ácidos graxos livres a partir do óleo de frango residual. A **Tabela 3** mostra os quatro fatores independentes (biocatalisador, razão molar (ácidos/álcool), temperatura e tempo) e seus níveis correspondentes.

Tabela 3 - Fatores independentes e seus níveis de conversão para o Taguchi

Níveis	Temperatura (°C)	Razão Molar	Biocatalisador (%)	Tempo (h)
I	30	1:1	5	1,5
II	40	1:7	10	3
III	55	1:13	15	4,5

Fonte: Elaborada pelo autor, 2020

A massa molar utilizada como referência para calcular a razão molar e a porcentagem de biocatalisador para cada nível foi determinada tendo como base um estudo prévio realizado no Grupo de Engenharia Enzimática (GENEZ) (ROCHA et al., 2020).

O Software Statistica® 10 foi empregado para o desenho experimental e análise estatística. A **Tabela 5** vai apresentar o desenho experimental juntamente com a atividade do biocatalisador e as relações S/R (sinal-ruído) calculadas. Os valores das relações S/R correspondentes aos valores da atividade do biocatalisador serão calculados a partir das características da função "greater-is-better", uma vez que o objetivo deste estudo é maximizar a resposta (conversão). O valor da relação S/R para cada experimento foi calculado de acordo com a Equação 3.

$$S/R = -10 \log(1/n \sum_{i=1}^n 1/y_i^2) \quad (3)$$

Em que, y é a conversão para o experimento correspondente, i é o número de repetições e n é o número de respostas para a combinação de níveis de fator em qualquer combinação paramétrica. A relação S/R prevista sob condições ideais, pois o processo de obtenção da conversão foi estimado pela Equação 4 (CHAKRABORTY; ROYCHOWDHURY, 2013).

$$S/R_{previsto} = \bar{S}/R + \sum_{j=1}^n (S/R_j - \bar{S}/R) \quad (4)$$

Em que, \bar{S}/R é a média aritmética de todas as razões S/R, S/R_j é a razão S/R no ponto ótimo para cada fator e n é o número de fatores que afetam significativamente o processo.

Independentemente da categoria de relação S/R empregada, o nível ideal do parâmetro de projeto é o nível com a relação S/R mais alta. É possível otimizar cada um dos parâmetros selecionados e obter o conjunto de parâmetros para o melhor rendimento do biodiesel por meio da análise da relação S/R. No entanto, a identificação do fator mais influenciado e da contribuição de cada um dos fatores na produtividade não é possível por meio da análise da relação S/R. As limitações da análise da razão S/R foram alcançadas realizando ANOVA dos dados de conversão CTO de acordo com as Equações (ADEWALE; VITHANAGE; CHRISTOPHER, 2017).

$$\text{Contribuição do fator, } \% = (SS_f/SS_T) * 100 \quad (5)$$

Onde SS_f é a soma dos quadrados dos fatores, e SS_T é a soma total de quadrados de todos os parâmetros.

$$SS_f = \sum_{j=1}^3 n[S/R]_{fj} - (S/R)_T]^2 \quad (6)$$

Onde n é o número de experimentos no nível j do fator f e total, T .

$$SS_T = \sum_{i=1}^9 [S/R]_i - (S/R)_T]^2 \quad (7)$$

Um teste de validação com três ensaios foi realizado com o conjunto de parâmetros ótimos. A variação foi verificada entre o previsto e resposta experimental.

5 RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO

5.1 Seleção da melhor combinação de lipase

Os biocatalisadores enzimáticos vêm ganhando espaço, seja na indústria ou na academia, por possuírem alta especificidade e alta seletividade de substrato, sendo uma vantagem em comparação aos catalisadores químicos, uma vez que, evita a produção de subprodutos indesejados (CHAPMAN; ISMAIL; DINU, 2018; KLEINAITÈ et al., 2014). Em outras palavras, uma enzima possui maior afinidade com um determinado ácido graxo, sendo assim, uma única enzima possui atividade catalítica baixa para um substrato heterogêneo, o que resulta em baixas taxas de conversões (PETERSEN et al., 2001).

Como é possível observar na **Tabela 2**, o óleo de frango residual é composto por diversos ácidos graxos, que possuem tamanho de cadeia carbônica distintos e podem ser insaturados ou saturados. Sendo assim, se torna difícil determinar uma única enzima para catalisar a reação de esterificação com o óleo de frango residual, portanto, justifica-se o emprego do conceito de combi-lipase, que se trata da mistura de três enzimas de especificidade e seletividade diferentes, com o intuito de encontrar a melhor combinação para o substrato utilizado (POPPE et al., 2018).

Os resultados do planejamento triangular realizado para definir a melhor combinação de enzimas para catalisar a esterificação do óleo de frango residual são mostrados na **Tabela 4** e são representados graficamente na **Figura 5**.

Tabela 4 - Níveis para os parâmetros analisados na síntese de biodiesel a partir de AGLs

RUN	RML	TLL	CALB	CONVERSÃO (%)
1	1,000	0,000	0,000	57,64 ± 0,45
2	0,000	1,000	0,000	43,43 ± 0,65
3	0,000	0,000	1,000	65,30 ± 0,64
4	0,500	0,500	0,000	55,20 ± 0,40
5	0,500	0,000	0,500	68,03 ± 0,29
6	0,000	0,500	0,500	47,91 ± 0,30
7	0,333	0,333	0,333	65,82 ± 0,64
8	0,667	0,167	0,167	61,27 ± 0,39
9	0,167	0,667	0,167	48,98 ± 0,22
10	0,167	0,167	0,667	68,99 ± 0,22

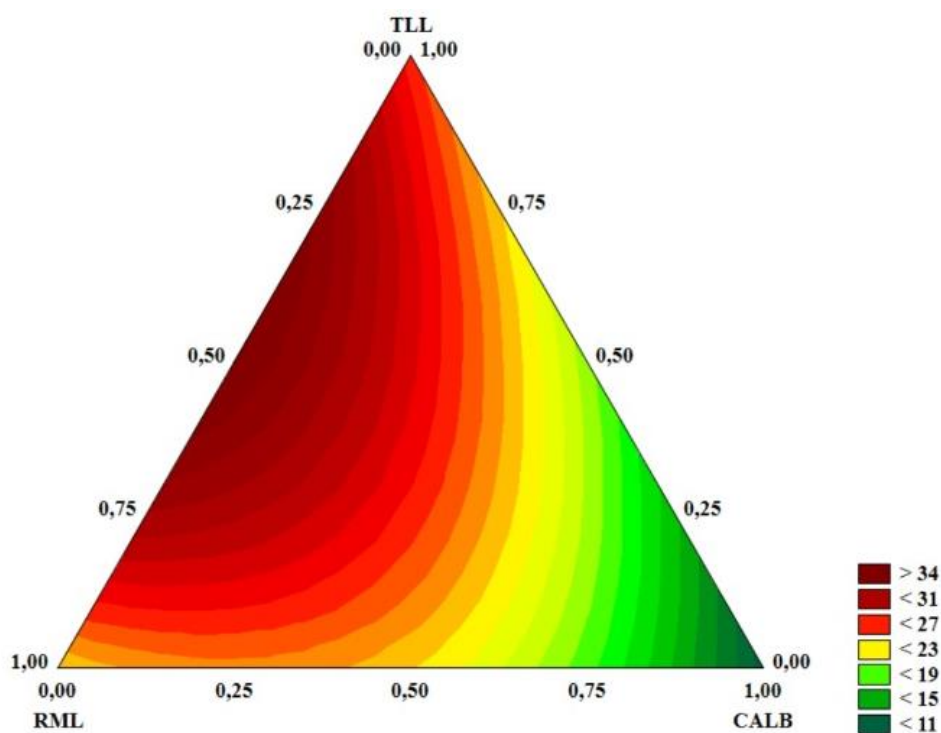
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A maior conversão (68,99%) foi obtida no ponto 10, usando uma combinação de 16,7% de RML, 16,7% de TLL e 66,7% de CALB; enquanto a menor conversão ocorreu no

ponto 2, tendo como catalisador 100% de TLL (**Tabela 4**). De acordo com a análise estatística, a melhor combinação de lipases para esterificação de óleo de frango é uma mistura de 62,5% de CALB e 37,5% de RML. Logo, essa mistura de biocatalisadores foi utilizada na otimização dos parâmetros de esterificação pelo método Taguchi.

A combinação obtida pode ser explicada analisando a seletividade e especificidade de cada enzima e o perfil de reação de cada lipase de acordo com o comprimento da cadeia dos substratos. O ponto ótimo foi validado nas mesmas condições dos experimentos do planejamento, a conversão obtida e o desvio padrão foi $74,53 \pm 0,74\%$.

Figura 5 - Superfície de resposta triangular para projeto experimental. Meio reacional: razão molar de 1:1 (AGLs/álcool) e teor de biocatalisador de 5% em massa de AGLs. As reações foram conduzidas a 30 °C por 1,5 horas a 200 rpm



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Como pode ser visto na **Tabela 2**, em média mais de 70% dos ácidos graxos presentes no óleo de frango residual são insaturados (somando os poli e os mono insaturados). A tampa presente na superfície da CALB facilita o acesso ácidos graxos insaturados ao sítio ativo da lipase, logo a CALB possui uma afinidade maior para AGLs insaturados (DEREWENDA; DEREWENDA; DODSON, 1992; GOTOR-FERNÁNDEZ; BUSTO; GOTOR, 2006). Isso pode justificar as maiores conversões nos experimentos que utilizaram a CALB, sendo o biocatalisador composto por apenas a CALB ou CALB em conjunto com as outras enzimas, e conseqüentemente, a presença de 62,5% da CALB na melhor combinação.

Ademais, a CALB é um lipase não régio-específica, ou seja, ela possui alta atividade em todas as três posições do AGLs, sendo assim, performa melhor na maioria dos AGLs quando comparado com RML e TLL, que são lipases específicas sn-1-3 (KAPOOR; GUPTA, 2012). Já a presença de 37a,5% de RML na melhor combinação pode ser justificada pela sua maior afinidade com AGLs de cadeia longa, em torno de C18 (PLEISS; FISCHER; SCHMID, 1998).

A técnica de combi-lipase pode diminuir o custo final do processo de produção de biodiesel, pois algumas lipases são mais caras, logo se for obtido uma combinação que envolva uma lipase mais barata é possível diminuir os custos do processo (CASTIGLIONI et al., 2020). Por exemplo, a RML custa menos do que a CALB, logo uma mistura dessas duas enzimas custa menos do que utilizar apenas a CALB. Rocha et al. 2020, estudou a melhor combinação de lipases na sua forma solúvel (CALB, CALA e TLL), na esterificação do óleo de frango residual para síntese de biodiesel, a combinação ótima foi de 67% CALB e 33% RML. Rocha et al. 2020 empregou o método de Taguchi para otimizar os parâmetros da reação (razão molar (AGL / álcool etílico), conteúdo do biocatalisador, temperatura e tempo), utilizando a combinação de lipases e o ponto ótimo dos parâmetros da reação foi possível alcançar 89,95% de conversão.

5.2 Análise do Taguchi

Tendo obtido a melhor combinação de enzimas, foi possível realizar o planejamento Taguchi com as porcentagens encontradas. Os valores de conversão no planejamento Taguchi e suas respectivas razões S/R são apresentados na **Tabela 5**. A maior conversão obtida se deu no experimento 4 (91,20%) sob as seguintes condições: 10% de biocatalisador, razão molar de 1:1, 45°C e 4,5 horas. Já a menor conversão se deu no experimento 1 (66,17%) sob 5% de biocatalisador, razão molar 1:1, 30°C e 1,5 horas.

Tabela 5 - Matriz de planejamento Taguchi L9 e seus respectivos valores de conversão e as relações S/R

	Biocatalisador (%)	Razão Molar (AGLs/Álcool)	Tempera tura (°C)	Tempo (h)	Conversão (%)	S/R
1	5	1:1	30	1,5	66,17 ± 0,07	36,41
2	5	1:7	45	3,0	75,50 ± 0,12	37,55
3	5	1:13	60	4,5	74,40 ± 0,24	37,43
4	10	1:1	45	4,5	91,20 ± 0,04	39,20
5	10	1:7	60	1,5	82,62 ± 0,01	38,34
6	10	1:13	30	3,0	83,98 ± 0,14	38,48
[7	15	1:1	60	3,0	74,89 ± 0,10	37,48

8	15	1:7	30	4,5	72,55 ± 0,05	37,21
9	15	1:13	45	1,5	84,44 ± 0,38	38,53

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) são apresentados na **Tabela 6**, com nível de confiança de 97,40%. Nessa análise quando maior o valor do parâmetro f-valor maior a influência da variável na conversão, as variáveis que apresentaram maior valor de f-valor foram, biocatalisador e Temperatura, com 69,131 e 33,098 respectivamente. Outro parâmetro importante para analisar a influência de uma variável independente na conversão é o p-valor, ele indica a probabilidade de o f-valor obtido ser influência por ruído, a importância do parâmetro é atestada para um valor de p-valor abaixo de 0,05, ou seja, apenas 5% do resultado obtido ter sido influenciado por ruído. Dito isso, porcentagem de biocatalisador e temperatura apresentaram p-valor menor do que 0,05, logo, essas variáveis são estatisticamente significativas. A soma dos quadrados (SS) indica a relevância do modelo, o modelo estudado apresentou um SS de 5,761 valor alto suficiente para ser considerado significativo.

Tabela 6 - Resultados de ANOVA para parâmetros que afetam a conversão de éster. O efeito fatorial insignificante é agrupado conforme mostrado

Parâmetro	DF	SS	MS	F-valor	P-valor	Contribuição (%)
Biocatalisador	2	3,610	1,805	69,131	0,014	62,662
Razão Molar	2	0,397	0,200	7,617	0,116	6,891
Temperatura	2	1,728	0,864	33,098	0,029	29,994
Tempo	2	-	-	-	-	-
Erro	2	0,026	-	-	-	0,045
Total	8	5,761				100

DF = Grau de liberdade; SS = Soma dos quadrados; MS = Quadrados médios. Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A **Tabela 7** apresenta a classificação dos parâmetros com base nos valores delta, que é a diferença entre o maior e o menor valor da relação S/R por nível. O delta serve para indicar o quanto cada parâmetro influencia no processo de conversão de AGLs de frango em éster, quanto maior o valor de delta, maior é a influência do fator em questão. Logo, os resultados apresentados na **Tabela 7** corroboram com os resultados da ANOVA, pois indicam o teor de biocatalisador como parâmetros que mais influenciou positivamente a reação de esterificação com um delta de 1,54, a sequência dos demais parâmetros foi temperatura (1,06), razão molar (0,44) e tempo (0,18).

Tabela 7 - Tabela de resposta de relações S/R. Mais detalhes são fornecidos na seção Materiais e Métodos

	Biocatalisador (%)	Razão Molar (AGLs/Álcool)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
L1	37,13	37,70	37,36	37,76
L2	38,67	37,70	38,42	37,84
L3	37,74	38,14	37,75	37,94
Delta	1,54	0,44	1,06	0,18
Ranking	1	3	2	4

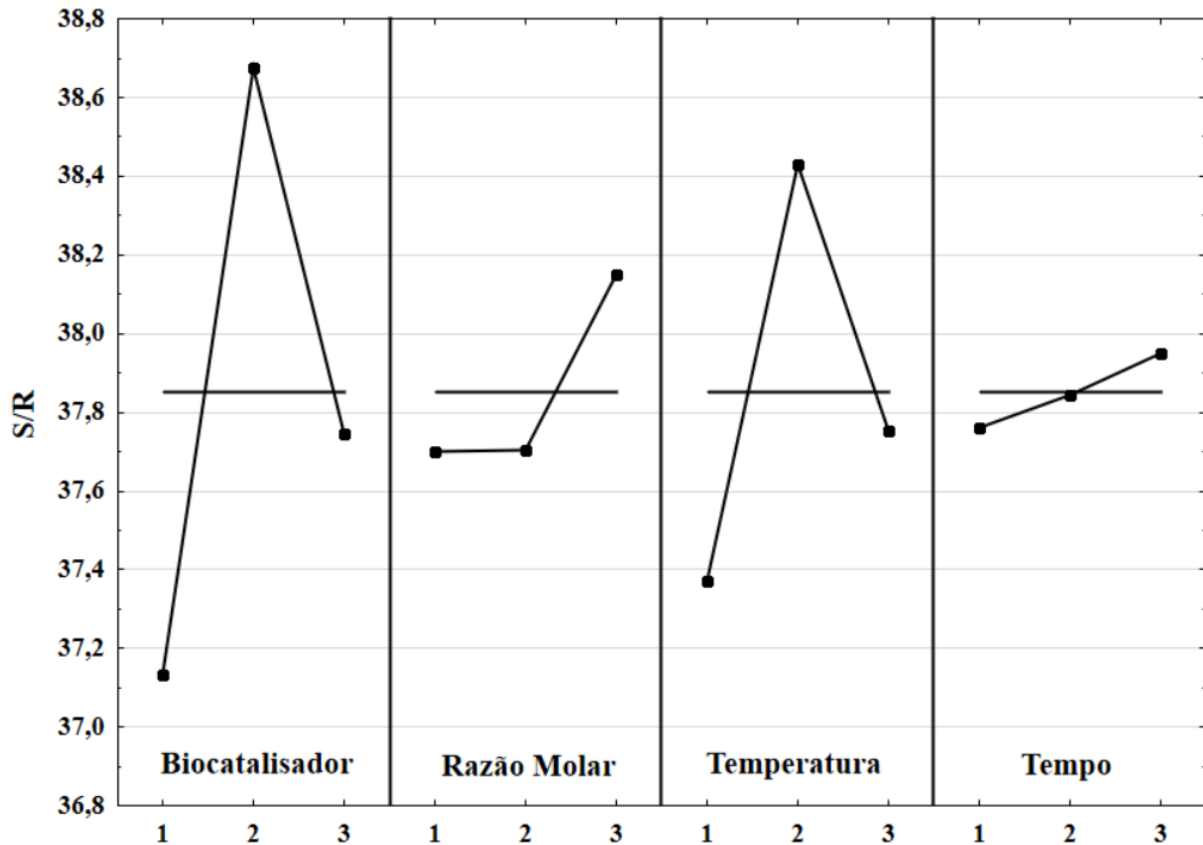
Fonte: Elabora pelo autor, 2020.

A **Figura 6** apresenta os gráficos das razões S/R para cada variável. O nível que possui maior relação S/R, corresponde ao nível ideal da variável independente na reação, ou seja, a combinação dos níveis de cada variável independente é o ponto ótimo da reação. Sendo assim, o ponto ótimo obtido foi: biocatalisador (L2 – 10%), razão molar (L3 – 1:13), temperatura (L2 - 45°C) e tempo (L3 – 4,5 horas). A relação S/R ideal prevista para as condições otimizadas foi calculado a partir da Equação 4 (CHOWDHURY et al., 2014). O valor do S/R esperado foi de 39,55 e a conversão prevista 94,50 %. A fim de validar as condições ideais realizaram-se experimentos nas condições ideais em duplicata, o resultado obtido foi de 93,07% de conversão, com o desvio padrão de 0,027.

Como pode ser visto na Figura 6 o melhor nível para o biocatalisador é o L2, é provável que ao aumentar mais catalisador, o excesso de lipase seja um inibidor para a reação, diminuindo a conversão. Por outro lado, o nível L1 possui pouca quantidade de enzima, sendo incapaz de catalisar todo o substrato (WAGHMARE; RATHOD, 2016).

Quanto a temperatura, o melhor nível foi L2, sabe-se que a esterificação é uma reação endotérmica, portanto maiores temperaturas apresentam maiores taxas de conversão, por possuírem maior energia cinética. Contudo, uma temperatura muito alta pode desnaturar a lipase, nesse contexto justifica-se o melhor nível para esse parâmetro ter sido o intermediário.

Figura 6 - Gráfico da razão S/R para esterificação de AGLs oriundos de óleo de frango



Fonte: Elaborada pelo autor, 2020.

A equação do modelo de regressão do presente estudo foi obtida da ANOVA e o fator de contribuição. O modelo foi determinado pela eliminação gradual do fator insignificante e é apresentado na equação 8.

$$\text{Conversão} = 64,9 + 2,63 * A + 1,76 * B + 1,54 * C + 0,82 * D \quad (8)$$

Onde: A é o biocatalisador (%), B é a razão molar, C é o tempo (horas) e D é a temperatura (°C). a partir da equação xx é possível prever e otimizar o rendimento da reação realizando os experimentos em qualquer conjunto paramétrico de condições dentro da faixa escolhida de parâmetros de processo.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo pretende contribuir para o aproveitamento do óleo residual de frango tendo como foco a otimização da produção de ésteres etílicos (biodiesel) catalisados por meio da combinação de lipases com o auxílio do planejamento experimental Taguchi.

Os resultados demonstraram que a melhor combinação de lipases para esterificação de óleo de frango foi de 62,5% de CALB e 37,5% de RML, já a melhor conversão alcançada utilizando a combinação no planejamento do Taguchi foi no experimento 4 com o valor de $91,20 \pm 0,04$ sob as seguintes condições: 10% de biocatalisador, razão molar de 1:1, 45 °C e 4,5 horas. A menor conversão se deu no experimento 1 ($66,17 \pm 0,07$) sob 5% de biocatalisador, razão molar 1:1, 30 °C e 1,5 horas e o ponto ótimo obtido com a combinação dos níveis de cada variável independente foi de biocatalisador (L2 – 10%), razão molar (L3 – 1:13), temperatura (L2 – 45 °C) e tempo (L3 – 4,5 horas) e o erro sob condições otimizadas das variáveis experimentais e teóricas foi de 1,46%.

Os parâmetros que mais influenciaram nos resultados dessas conversões foram o biocatalisador com delta de 1,54 e a temperatura com delta 1,06, em contrapartida, os que menos influenciaram foram razão molar com delta de 0,44 e tempo com delta de 0,18. Ademais, a combinação de lipases, técnica aplicado no estudo, possibilita a viabilidade econômica para produção do biodiesel, pois a lipase CALB apresenta um custo maior em relação as lipases TLL e RML. Dado a esses resultados, é possível inferir a possibilidade de usar o óleo de frango residual como matéria-prima na matriz de produção do biodiesel catalisada por uma combinação de lipases CALB e RML.

REFERÊNCIAS

- ABOMOHR, A. E. F. et al. Potential of fat, oil and grease (FOG) for biodiesel production: A critical review on the recent progress and future perspectives. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 81, p. 100868, 2020.
- ADEWALE, P.; VITHANAGE, L. N.; CHRISTOPHER, L. Optimization of enzyme-catalyzed biodiesel production from crude tall oil using Taguchi method. **Energy Conversion and Management**, v. 154, n. July, p. 81–91, 2017.
- ALMEIDA, T. DOS S. Estudo da Reação de Transesterificação de Óleo de Soja e Pinhão-manso Por Metanólise e Etanólise. p. 108, 2016.
- ALPTEKIN, E.; CANAKCI, M. Optimization of pretreatment reaction for methyl ester production from chicken fat. **Fuel**, v. 89, n. 12, p. 4035–4039, dez. 2010.
- ALVAREZ SERAFINI, M. S.; TONETTO, G. M. PRODUCTION OF FATTY ACID METHYL ESTERS FROM AN OLIVE OIL INDUSTRY WASTE. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 285–297, mar. 2019.
- AMARAL, L. C. G. S.; ABREU, Y. V. DE. Evolução do Mercado Brasileiro de Biodiesel sob a Ótica dos Leilões Promovidos pela ANP: 2005 a 2014. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 54, n. 4, p. 729–750, dez. 2016.
- AMBIENTE, E. M. POLÍTICAS PÚBLICAS E DINÂMICAS DO MERCADO DE BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL : UMA ANÁLISE CRÍTICA DOS ENTRAVES E PERSPECTIVAS JUNTO AO BIODIESEL POLÍTICAS PÚBLICAS E DINÂMICAS DO MERCADO DE BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL : UMA ANÁLISE CRÍTICA DOS. 2019.
- AMIN, A. Review of diesel production from renewable resources: Catalysis, process kinetics and technologies. **Ain Shams Engineering Journal**, v. 10, n. 4, p. 821–839, 2019.
- ANOBOM, C. D. et al. From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–11, 2014.
- ANP. Ranp 45 - 2012. 2014.
- ANP. **PANORAMA DE ABASTECIMENTO DE COMBUSTÍVEIS 2016**. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/images/publicacoes/livros_e_revistas/Panorama_do_Abastecimento2016.pdf>. Acesso em: 28 fev. 2021.
- ANP, A. N. DE P. G. N. E B. **Precificação do Querosene de Aviação no Brasil**. Brasília-DF: [s.n.].
- ARUN, J. et al. Technical insights into the production of green fuel from CO₂ sequestered algal biomass: A conceptual review on green energy. **Science of The Total Environment**, v. 755, p. 142636, fev. 2021.
- ASTM. **ASTM D6751-20a Especificação padrão para estoque de mistura de combustível de biodiesel (B100) para combustíveis destilados médios**. Disponível em: <<https://www.astm.org/Standards/D6751.htm>>. Acesso em: 26 jan. 2021.
- BARROS, M.; FLEURI, L. F.; MACEDO, G. A. Seed lipases: sources, applications and properties - a review. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 1, p. 15–29, mar. 2010.

BASSO, A.; SERBAN, S. Industrial applications of immobilized enzymes—A review. **Molecular Catalysis**, v. 479, p. 110607, dez. 2019.

BASUMATARY, S. et al. Utilization of renewable and sustainable basic heterogeneous catalyst from *Heteropanax fragrans* (Kessuru) for effective synthesis of biodiesel from *Jatropha curcas* oil. **Fuel**, v. 286, p. 119357, fev. 2021.

BAUER, L. C. et al. Physicochemical and thermal characterization of babassu oils (*Orbignya phalerata* Mart.) obtained by different extraction methods. **Food Research International**, v. 137, p. 109474, nov. 2020.

BEHÇET, R. et al. Comparison of exhaust emissions of biodiesel–diesel fuel blends produced from animal fats. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 46, p. 157–165, jun. 2015.

BISCHOFF, T. Z. et al. TECHNOLOGICAL QUALITY OF SOYBEAN OIL OBTAINED FROM STORED GRAIN UNDER CONTROLLED ENVIRONMENTAL CONDITIONS. **Engenharia Agrícola**, v. 36, n. 6, p. 1145–1156, dez. 2016.

BORTOLETO, G. et al. Produção de biodiesel a partir de resíduos gordurosos de frango. **Bioenergia em Revista: Diálogos (ISSN: 2236-9171)**, v. 7, n. 2, p. 77–97, 2018.

BURUK SAHIN, Y.; AKTAR DEMIRTAŞ, E.; BURNAK, N. Mixture design: A review of recent applications in the food industry. **Pamukkale University Journal of Engineering Sciences**, v. 22, n. 4, p. 297–304, 2016.

CALERO, J. et al. Rhizomucor miehei Lipase Supported on Inorganic Solids, as Biocatalyst for the Synthesis of Biofuels: Improving the Experimental Conditions by Response Surface Methodology. **Energies**, v. 12, n. 5, p. 831, mar. 2019.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. USE OF MODIFIED SILICAS FOR LIPASE IMMOBILIZATION. **Química Nova**, 2014.

CASTIGLIONI, G. Z. et al. Production of volatile compounds by yeasts using hydrolysed grape seed oil obtained by immobilized lipases in continuous packed-bed reactors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 43, n. 8, p. 1391–1402, ago. 2020.

CAVALCANTE, F. T. T. et al. Opportunities for improving biodiesel production via lipase catalysis. **Fuel**, p. 119577, nov. 2020.

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Improved production of biolubricants from soybean oil and different polyols via esterification reaction catalyzed by immobilized lipase from *Candida rugosa*. **Fuel**, v. 215, n. October 2017, p. 705–713, 2018.

CHAKRABORTY, R.; ROYCHOWDHURY, D. Fish bone derived natural hydroxyapatite-supported copper acid catalyst: Taguchi optimization of semibatch oleic acid esterification. **Chemical Engineering Journal**, v. 215–216, p. 491–499, 2013.

CHAPMAN, J.; ISMAIL, A.; DINU, C. Industrial Applications of Enzymes: Recent Advances, Techniques, and Outlooks. **Catalysts**, v. 8, n. 6, p. 238, jun. 2018.

CHIU, M. C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L. A. Fracionamento a seco da gordura de frango em escala piloto. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 3, p. 421–434, 2007.

CHOWDHURY, A. et al. Optimization of the production parameters of octyl ester biolubricant using Taguchi's design method and physico-chemical characterization of the product. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 783–789, jan. 2014.

CNPE. Resolução nº16, de 29 de outubro de 2018. **Conselho Nacional De Política Energética**, p. 15–16, 2018.

COLOMBO, K.; ENDER, L.; BARROS, A. A. C. The study of biodiesel production using CaO as a heterogeneous catalytic reaction. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 26, n. 2, p. 341–349, jun. 2017.

CORTEZ, D. V.; DE CASTRO, H. F.; ANDRADE, G. S. S. Potencial catalítico de lipases ligadas ao micélio de fungos filamentosos em processos de biotransformação. **Química Nova**, 30 ago. 2016.

COSTA, Y. J. et al. Energetic and exergetic analyses of a dual-fuel diesel engine. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 7, p. 4651–4660, set. 2012.

CURTIN, J. et al. Quantifying stranding risk for fossil fuel assets and implications for renewable energy investment: A review of the literature. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 116, n. September, p. 109402, 2019.

DABDOUB, M. J.; BRONZEL, J. L.; RAMPIN, M. A. Biodiesel: visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 776–792, 2009.

DALL'AGNOL, A. **Por que fazemos biodiesel de soja.**

DARMAJANA, D. A.; AFIFAH, N.; INDRIATI, A. The effect of extraction method and types of coagulants on the results and physicochemical properties of tofu. **Food Science and Technology**, v. 40, n. suppl 2, p. 677–682, dez. 2020.

DEMIRBAS, A. Distillation properties of various diesel oils. **Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization and Environmental Effects**, v. 30, n. 16, p. 1484–1490, 2008.

DEREWENDA, Z. S.; DEREWENDA, U.; DODSON, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. **Journal of Molecular Biology**, v. 227, n. 3, p. 818–839, out. 1992.

DHAWANE, S. H. et al. Parametric optimisation of biodiesel synthesis from waste cooking oil via Taguchi approach. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 4, p. 3971–3980, ago. 2018.

EM, P. D. E. P. Universidade federal de alagoas centro de ciências agrárias programa de pós-graduação em agronomia. 2011.

EMBRAPA. **Estatísticas | Mundo | Frangos de corte - Portal Embrapa**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/suinos-e-aves/cias/estatisticas/frangos/mundo>>. Acesso em: 12 fev. 2021.

FAYYAZBAKHS, A.; PIROUZFAR, V. Comprehensive overview on diesel additives to reduce emissions, enhance fuel properties and improve engine performance. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 74, n. January, p. 891–901, 2017.

FEHMBERGER, C. et al. Effectiveness of incorporation of crude glycerin as a source of labile carbon in the composting of poultry production residues. **Journal of Cleaner Production**, v. 251, p. 119739, abr. 2020.

FERNANDES, K. F.; LIMA, C. S.; LOPES, F. M. Técnicas de Imobilização de Enzimas. **Revista Processos Químicos**, v. 4, n. 7, p. 53–58, 4 jan. 2010.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects

- as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3–4, p. 197–212, mar. 2010.
- FERREIRA, A. B.; LEMOS CARDOSO, A.; DA SILVA, M. J. Tin-Catalyzed Esterification and Transesterification Reactions: A Review. **ISRN Renewable Energy**, v. 2012, p. 1–13, 21 nov. 2012.
- FONSECA, A. M. DA et al. Enzymatic Biocatalyst using enzymes from Pineapple (*Ananas comosus*) Peel Immobilized in Hydrogel Beads. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 23, p. 32, 1 jun. 2019.
- FOROUTAN, R.; MOHAMMADI, R.; RAMAVANDI, B. Waste glass catalyst for biodiesel production from waste chicken fat: Optimization by RSM and ANNs and toxicity assessment. **Fuel**, v. 291, p. 120151, maio 2021.
- FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 3, p. 437–448, 2013.
- GAITONDE, V. N.; KARNIK, S. R.; DAVIM, J. P. Multiple performance optimization in drilling using Taguchi method with utility and modified utility concepts. In: **Materials Forming and Machining**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 99–115.
- GARMROODI, M. et al. Covalent binding of hyper-activated *Rhizomucor miehei* lipase (RML) on hetero-functionalized siliceous supports. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 86, p. 208–215, maio 2016.
- GHOSH, S. K. Biomass & Bio-waste Supply Chain Sustainability for Bio-energy and Bio-fuel Production. **Procedia Environmental Sciences**, v. 31, p. 31–39, 2016.
- GIRARDI, J. C. et al. Natural compounds as antifreeze additives to improve babassu biodiesel. **Fuel**, v. 289, p. 119746, abr. 2021.
- GOLDEMBERG, J.; MOREIRA, J. R. Política energética no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 19, n. 55, p. 215–228, 2005.
- GONÇALVES, M. C. P. et al. Trends on enzyme immobilization researches based on bibliometric analysis. **Process Biochemistry**, v. 76, p. 95–110, jan. 2019.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V.; BUSTO, E.; GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 348, n. 7–8, p. 797–812, maio 2006.
- GUTIÉRREZ-ANTONIO, C. et al. A review on the production processes of renewable jet fuel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 79, n. May, p. 709–729, 2017.
- HARRIS, T. M. et al. Logistic growth curve modeling of US energy production and consumption. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 96, n. July, p. 46–57, 2018.
- HASANUZZAMAN, M. et al. Energy demand. In: **Energy for Sustainable Development**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 41–87.
- HÖCK, H. et al. Comparison of *Candida antarctica* Lipase B Variants for Conversion of ϵ -Caprolactone in Aqueous Medium—Part 2. **Polymers**, v. 10, n. 5, p. 524, maio 2018.
- HUANG, D.; ZHOU, H.; LIN, L. Biodiesel: an Alternative to Conventional Fuel. **Energy Procedia**, v. 16, p. 1874–1885, 2012.

IEA. Co 2 Emissions From Fuel Combustion 2020 Edition. **International Energy Agency**, 2020.

JUBILUT, P. R. Avaliação Do Potencial De Gorduras Animais No Estado De Santa Química Química. 2010.

KADIR YESILYURT, M.; CESUR, C. Biodiesel synthesis from *Styrax officinalis* L. seed oil as a novel and potential non-edible feedstock: A parametric optimization study through the Taguchi technique. **Fuel**, v. 265, n. December 2019, p. 117025, 2020.

KAHIA, M.; AÏSSA, M. S. BEN; LANOUAR, C. Renewable and non-renewable energy use - economic growth nexus: The case of MENA Net Oil Importing Countries. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 71, n. June 2015, p. 127–140, 2017.

KAJASTE, R. Chemicals from biomass – managing greenhouse gas emissions in biorefinery production chains – a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, p. 1–10, jul. 2014.

KALE, B. N.; PATLE, S. D.; KALAMBE, S. R. Microalgae biodiesel and its various diesel blends as promising alternative fuel for diesel engine. **Materials Today: Proceedings**, fev. 2021.

KAPOOR, M.; GUPTA, M. N. Lipase promiscuity and its biochemical applications. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 4, p. 555–569, abr. 2012.

KARIM, A. et al. Microalgal Cell Disruption and Lipid Extraction Techniques for Potential Biofuel Production. In: **Microalgae Cultivation for Biofuels Production**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 129–147.

KARMAKAR, B.; DHAWANE, S. H.; HALDER, G. Optimization of biodiesel production from castor oil by Taguchi design. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 6, n. 2, p. 2684–2695, abr. 2018.

KIRUBAKARAN, M.; ARUL MOZHI SELVAN, V. A comprehensive review of low cost biodiesel production from waste chicken fat. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 82, p. 390–401, fev. 2018.

KLEINAITÈ, E. et al. A cleaner approach for biolubricant production using biodiesel as a starting material. **Journal of Cleaner Production**, v. 75, p. 40–44, jul. 2014.

KNOTHE, G. Biodiesel and renewable diesel: A comparison. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 36, n. 3, p. 364–373, jun. 2010.

KOHLHEPP, G. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 68, p. 223–253, 2010.

LEKAN, T. . . et al. Cd(II) biosorption using bacterial isolates from sawdust: optimization via orthogonal array Taguchi method. **Water SA**, v. 46, n. 4 October, 27 out. 2020.

LI, S. et al. TECHNOLOGY PROSPECTING ON ENZYMES: APPLICATION, MARKETING AND ENGINEERING. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. e201209017, set. 2012.

LIN, C.-W.; TSAI, S.-W. Production of biodiesel from chicken wastes by various alcohol-catalyst combinations. **Journal of Energy in Southern Africa**, v. 26, n. 1, p. 36–45, 23 mar. 2015.

LÓPEZ-ANDRÉS, J. J. et al. Environmental impact assessment of chicken meat production via

an integrated methodology based on LCA, simulation and genetic algorithms. **Journal of Cleaner Production**, v. 174, p. 477–491, fev. 2018.

LÚCIO, A. D.; SARI, B. G. Planning and implementing experiments and analyzing experimental data in vegetable crops: problems and solutions. **Horticultura Brasileira**, v. 35, n. 3, p. 316–327, set. 2017.

MACHADO, L. A. Z. et al. Establishment of perennial forages intercropped with soybean for integrated crop-livestock systems. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 52, n. 7, p. 521–529, jul. 2017.

MAHLIA, T. M. I. et al. Patent landscape review on biodiesel production: Technology updates. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 118, n. April 2019, p. 109526, 2020.

MARTINS, F.; FELGUEIRAS, C.; SMITKOVÁ, M. Fossil fuel energy consumption in European countries. **Energy Procedia**, v. 153, p. 107–111, 2018.

MASIERO, G. Desenvolvimento dos biocombustíveis no Brasil e no Leste Asiático: experiências e desafios. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 54, n. 2, p. 97–117, 2011.

MASIERO, G.; LOPES, H. Etanol e biodiesel como recursos energéticos alternativos: perspectivas da América Latina e da Ásia. **Revista Brasileira de Política Internacional**, v. 51, n. 2, p. 60–79, dez. 2008.

MEHER, L.; VIDYASAGAR, D.; NAIK, S. Technical aspects of biodiesel production by transesterification—a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 10, n. 3, p. 248–268, jun. 2006.

MILAZZO, M. F. et al. Sustainable soy biodiesel. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 27, p. 806–852, nov. 2013.

MITAL, A. et al. Design for Usability. In: **Product Development**. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 335–418.

MITTERSTEINER, M. et al. Easy and Simple SiO₂ Immobilization of Lipozyme CaLB-L: Its Use as a Catalyst in Acylation Reactions and Comparison with Other Lipases. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2016.

MOAZENI, F.; CHEN, Y.-C.; ZHANG, G. Enzymatic transesterification for biodiesel production from used cooking oil, a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 216, p. 117–128, abr. 2019.

MOHAMED, S. A. N. et al. Optimization Method of Injection Molding Parameters for Vinyl-Based Polymer Composites. In: **Natural Fibre Reinforced Vinyl Ester and Vinyl Polymer Composites**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 97–108.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Immobilization of Lipase A from *Candida antarctica* onto Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p. 4018, 17 ago. 2019.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Biotechnological relevance of the lipase A from *Candida antarctica*. **Catalysis Today**, mar. 2020.

MONTEIRO, R. R. C. et al. Liquid lipase preparations designed for industrial production of biodiesel. Is it really an optimal solution? **Renewable Energy**, v. 164, p. 1566–1587, fev. 2021.

- MOREIRA, K. S. et al. Optimization of the Production of Enzymatic Biodiesel from Residual Babassu Oil (*Orbignya* sp.) via RSM. **Catalysts**, v. 10, n. 4, p. 414, abr. 2020.
- MOSER, B. R. Fuel property enhancement of biodiesel fuels from common and alternative feedstocks via complementary blending. **Renewable Energy**, v. 85, p. 819–825, 2016.
- NAVAS-ANGUITA, Z.; GARCÍA-GUSANO, D.; IRIBARREN, D. A review of techno-economic data for road transportation fuels. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 112, n. September 2018, p. 11–26, 2019.
- NISAR, J. et al. Enhanced biodiesel production from *Jatropha* oil using calcined waste animal bones as catalyst. **Renewable Energy**, v. 101, p. 111–119, 2017.
- NORJANNAH, B. et al. Enzymatic transesterification for biodiesel production: a comprehensive review. **RSC Advances**, v. 6, n. 65, p. 60034–60055, 2016.
- ONG, H. C. et al. Recent advances in biodiesel production from agricultural products and microalgae using ionic liquids: Opportunities and challenges. **Energy Conversion and Management**, v. 228, p. 113647, jan. 2021.
- PATCHIMPET, J. et al. Optimization of process variables for the production of biodiesel by transesterification of used cooking oil using lipase from Nile tilapia viscera. **Renewable Energy**, v. 153, p. 861–869, jun. 2020.
- PAULILLO, L. F. et al. Álcool combustível e biodiesel no Brasil: quo vadis? **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 45, n. 3, p. 531–565, set. 2007.
- PENG, F. et al. Enzyme Nanocarriers. In: **Advances in Enzyme Technology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 153–168.
- PEREZ, V. H. et al. Heterogeneous biocatalysis in solid/gas phase: principles and applications. **Química Nova**, v. 37, n. 2, 2014.
- PETERSEN, D. et al. Displacement and Strain Fields at a Stone/Mortar Interface by Digital Image Processing. **Journal of Testing and Evaluation**, v. 29, n. 2, p. 115, 2001.
- PINHEIRO, M. P. et al. Modulation of Lecitase properties via immobilization on differently activated Immobead-350: Stabilization and inversion of enantiospecificity. **Process Biochemistry**, v. 87, p. 128–137, dez. 2019.
- PLEISS, J.; FISCHER, M.; SCHMID, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1–2, p. 67–80, jun. 1998.
- POPPE, J. K. et al. Transesterification of Waste Frying Oil and Soybean Oil by Combi-lipases Under Ultrasound-Assisted Reactions. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 186, n. 3, p. 576–589, 2018.
- POURZOLFAGHAR, H. et al. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p. 245–257, 2016.
- PRUSZKO, R. Biodiesel production. In: **Bioenergy**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 491–514.
- QUADER, M. A.; AHMED, S. **Bioenergy with carbon capture and storage (BECCS): Future prospects of carbon-negative technologies**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017.
- RABBANI, G. et al. Impact of structural stability of cold adapted *Candida antarctica* lipase B (CaLB): in relation to pH, chemical and thermal denaturation. **RSC Advances**, v. 5, n. 26, p.

20115–20131, 2015.

RAHIMPOUR, M. R. Membrane reactors for biodiesel production and processing. In: **Membrane Reactors for Energy Applications and Basic Chemical Production**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 289–312.

RAJENDRAN, A.; PALANISAMY, A.; THANGAVELU, V. Lipase catalyzed ester synthesis for food processing industries. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 1, p. 207–219, fev. 2009.

RAMOS, E. Z. et al. Production and immobilization of *Geotrichum candidum* lipase via physical adsorption on eco-friendly support: Characterization of the catalytic properties in hydrolysis and esterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 118, p. 43–51, ago. 2015.

RAMOS, L. et al. Biodiesel: Raw Materials, Production Technologies and Fuel Properties. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 1, p. 317–369, 2017.

RATHORE, V.; NEWALKAR, B. L.; BADONI, R. P. Processing of vegetable oil for biofuel production through conventional and non-conventional routes. **Energy for Sustainable Development**, v. 31, p. 24–49, 2016.

REIS, C. et al. DESIGN OF IMMOBILIZED ENZYME BIOCATALYSTS: DRAWBACKS AND OPPORTUNITIES. **Química Nova**, 2019.

ROCHA, T. G. et al. Lipase Cocktail for Optimized Biodiesel Production of Free Fatty Acids from Residual Chicken Oil. **Catalysis Letters**, 2 set. 2020.

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

SAHOO, P. Tribological performance of electroless Ni-P coatings. In: **Materials and Surface Engineering**. [s.l.] Elsevier, 2012. p. 163–205.

SANTOS, J. C. S. et al. Versatility of divinylsulfone supports permits the tuning of CALB properties during its immobilization. **RSC Advances**, v. 5, n. 45, p. 35801–35810, 2015.

SCHIRMER, W. N.; RIBEIRO, C. B. PANORAMA DOS COMBUSTÍVEIS E BIOCOMBUSTÍVEIS NO BRASIL E AS EMISSÕES GASOSAS DECORRENTES DO USO DA GASOLINA/ETANOL. **BIOFIX Scientific Journal**, v. 2, n. 2, p. 16, 10 ago. 2017.

SCHMIDT, N. S.; SILVA, C. L. DA. Pesquisa e Desenvolvimento na Cadeia Produtiva de Frangos de Corte no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 3, p. 467–482, set. 2018.

SHARMA, A. et al. Effect of design parameters on performance and emissions of DI diesel engine running on biodiesel-diesel blends: Taguchi and utility theory. **Fuel**, v. 281, p. 118765, dez. 2020.

SHOBHANA-GNANASERKHAR et al. Biodiesel production via simultaneous esterification and transesterification of chicken fat oil by mesoporous sulfated Ce supported activated carbon. **Biomass and Bioenergy**, v. 141, p. 105714, out. 2020.

SINGH, D. et al. A review on feedstocks, production processes, and yield for different generations of biodiesel. **Fuel**, v. 262, n. July, p. 116553, 2020.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial Enzymes—An Overview. In: **Advances in Enzyme Technology**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 1–40.

SOENDERGAARD, N. Modern Monoculture and Periphery Processes: a World Systems Analysis of the Brazilian soy expansion from 2000-2012. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 56, n. 1, p. 69–90, mar. 2018.

SOUZA, L. T. DE A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4**. [s.l.] Editora Blucher, 2017. p. 529–568.

STEEVES, B. B.; OURIQUES, H. R. Energy Security: China and the United States and the Divergence in Renewable Energy. **Contexto Internacional**, v. 38, n. 2, p. 643–662, ago. 2016.

SU, C.-H. Kinetic study of free fatty acid esterification reaction catalyzed by recoverable and reusable hydrochloric acid. **Bioresource Technology**, v. 130, p. 522–528, fev. 2013.

TOKLU, E. Biomass energy potential and utilization in Turkey. **Renewable Energy**, v. 107, p. 235–244, jul. 2017.

TORRES, J. A. et al. Development of a reusable and sustainable biocatalyst by immobilization of soybean peroxidase onto magnetic adsorbent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1279–1287, jul. 2018.

TUTAK, W. et al. Alcohol-diesel fuel combustion in the compression ignition engine. **Fuel**, v. 154, n. April, p. 196–206, 2015.

VARGAS, B. S.; LISSNER, L. A.; METH, S. Biodiesel: Context, Characteristics, Advantages and Production. **Urcamp**, v. 1, p. 253–269, 2017.

VERTONHA, M. T.; DELGADO, L. A.; LUKASIEWICZ, G. V. B. Characterization of the Physicochemical Properties of Different Biodiesel Samples. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 61, n. spe, 2018.

WAGHMARE, G. V.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed hydrolysis of waste cooking oil under solvent free condition. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 32, p. 60–67, set. 2016.

WUEBBLES, D. J.; JAIN, A. K. Concerns about climate change and the role of fossil fuel use. **Fuel Processing Technology**, v. 71, n. 1–3, p. 99–119, jun. 2001.

XUE, Y. et al. Energy consumption and pollutant emission of diesel-fired combustion from 2009 to 2018 in Beijing, China. **Journal of Environmental Management**, v. 285, p. 112137, maio 2021.

YASIN, M. H. M. et al. **Physical properties and chemical composition of biofuels**. [s.l.] Elsevier Inc., 2019.

YESILYURT, M. K. et al. The production of biodiesel from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil as a potential feedstock and its usage in compression ignition engine: A comprehensive review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 119, n. October, p. 109574, 2020.

ZHONG, L. et al. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: A review from the waste to biodiesel production. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 152, p. 207–222, jun. 2020.

ZHONG, N. et al. Immobilization of *Rhizomucor miehei* lipase onto the organic functionalized

SBA-15: Their enzymatic properties and glycerolysis efficiencies for diacylglycerols production. **Food Chemistry**, v. 271, p. 739–746, jan. 2019.

ZHOU, W.; ZHANG, W.; CAI, Y. Laccase immobilization for water purification: A comprehensive review. **Chemical Engineering Journal**, v. 403, p. 126272, jan. 2021.

ZOU, B. et al. Enhancing bio-catalytic activity and stability of lipase nanogel by functional ionic liquids modification. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 195, p. 111275, nov. 2020.